

Title	微生物の生産する新規抗真菌抗生物質KB425796-A類縁体に関する研究(Dissertation_全文)
Author(s)	甲斐, 寛人
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-01-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12898
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

微生物の生産する新規抗真菌抗生物質
KB425796-A 類縁体に関する研究

甲斐寛人

目次

要旨	1
序論	3
第一章 新規抗真菌物質 KB425796-A の発見	10
第二章 新規抗真菌物質 KB425796-B-K の発見	32
第三章 新規抗真菌物質 KB425796-C の生物学的活性	57
総括	74
引用文献	77
謝辞	82
学術雑誌に発表した論文	83

略語

5-FC	Flucytosine
AMPH	Amphotericin B
CD ₃ OH	Deuterated methanol
CFU	Colony Formation Unit
Cit	Citruline
COSY	CORrelated SpectroscopY
CSFG	Caspofungin
CSL	Corn Steep Liquor
DEPT	Distortion less Enhancement by Polarization transfer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	Ethyl acetate
FFLZ	Fosfluconazole
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FLCZ	Fluconazole
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrared
ITCZ	Itraconazole
LB 培地	Lysogeny Broth 培地
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MCFG	Micafungin
MCZ	Miconazole
MEC	Minimum Effective Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NB 培地	Nutrient Broth 培地
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NX	Nikkomycin X
OHTrp	Hydroxytryptophan
Orn	Ornithine
PDA 培地	Potato Dextrose Agar 培地
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	TOTal Correlation SpectroscopY
VRCZ	Voriconazole
YM 培地	Yeast Malt Peptone Agar 培地
YNBD 培地	Yeast Nitrogen Base Dextrose 培地

要旨

深在性真菌症は、血液を含む体内各臓器に *Candida* 属, *Aspergillus* 属, *Cryptococcus* 属などの真菌が感染することによって生じる疾患である。現在使用されている主な深在性真菌症の治療薬としては amphotericin B, アゾール系抗真菌剤、カンディン系抗真菌剤があるものの、amphotericin B では強い腎毒性の副作用、アゾール系抗真菌剤では薬剤相互作用による抗癌剤や免疫抑制剤との併用の制限がある。近年開発されたカンディン系抗真菌剤の Micafungin, Caspofungin, Anidulafungin は、真菌細胞壁の構成要素である β -1,3-glucan 合成酵素を阻害し、副作用、薬物相互作用の比較的少ない使いやすい薬剤であるが、*Candida* 属に対しては強い殺菌作用を有するのに対して、*Aspergillus* 属に対しては静菌的な作用にとどまり、*Cryptococcus* 属, *Trichosporon* 属, *Rhizopus* 属などの病原真菌には作用しないという課題があり、満たされない治療上のニーズがある。

本研究では、上述の課題を解決する薬剤の開発を目的として *Aspergillus fumigatus* に抗真菌作用を有する新規な抗真菌物質の探索を行った。カンディン系抗真菌剤をはじめとする既知の真菌細胞壁合成阻害剤は *A. fumigatus* に作用させた場合に菌糸の特徴的な形態変化を誘導する。私は、自然界から単離したカビ、放線菌、バクテリアの培養液の有機溶媒抽出物（アセトン、メタノール等使用）を *A. fumigatus* に作用させ、その菌糸の形態変化を観察することで、新規な抗真菌物質 KB425796-A とそれを生産する *Paenibacillus* 属 530603 株を発見した。530603 株培養液から溶媒抽出法と液体クロマトグラフィー法により KB425796-A の白色粉末を単離し、HR-ESI-MS 分析、NMR 分析により KB425796-A の構造を 12 アミノ酸と脂肪酸側鎖からなる環状リポペプチドラクトン構造であると同定した。KB425796-A の抗真菌スペクトルを調べたところ *Aspergillus* 属の他に Micafungin 耐性である *Cryptococcus* 属, *Trichosporon* 属, *Rhizopus* 属, *Pseudallescheria* 属に抗真菌活性を有した。さらに、KB425796-A と同じ作用をもつ類縁体を 530603 株培養液から 10 種類単離し KB425796-B~K を得た。これら類縁体の抗真菌活性評価を行ったところ、KB425796-C において KB425796-A より 2 倍強い抗 *A. fumigatus* 活性が見られた。

KB425796-A, C と Micafungin はいずれも *A. fumigatus* の菌糸の正常な伸長を阻害する作用が

ある。KB425796-A, C と Micafungin を同時に *A. fumigatus* に作用させたところ、その菌糸の伸長は完全に阻害され、胞子から発芽した菌糸は球形に膨張しやがて破裂した。さらに KB425796-C と Micafungin の併用による抗 *A. fumigatus* 活性を詳細に調べたところ、強力な相乗作用があることが示され、それぞれ単独の薬剤では静菌的な作用に留まるところが、併用することで殺菌作用が得られることが示された。*A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおいても KB425796-C は単剤で延命効果が得られ、また micafungin と併用することで薬剤濃度依存的に組織内の生菌数を下げる事でさらに長期の延命効果が得られた。

序論

真菌症は表在性真菌症と深在性真菌症の二つに大別される^(1, 2)。表在性真菌症とは、感染が皮膚の表層（表皮とくにその角質層）、爪、毛髪または皮膚に隣接する扁平上皮粘膜（口腔や膣）の表層にとどまり、皮下組織や粘膜下組織に波及する事のない真菌症であり、皮膚真菌症とも呼ばれる。代表的なものとして、*Trichophyton* 属による白癬菌症（俗称：水虫）がある。これらは、一般に健常人でも感染するが、それによって直接生命が脅かされることは無く、また既存の塗布薬等によって治療効果が得られることが多い。一方、深在性真菌症は、一般に重篤な感染症であり、不顕性感染、または一部の比較的良好な病型をのぞいて、いったん発症すると生命に関わる危険性があり、一説には本邦で年間 20 万人の患者が治療を必要としていると言われている。深在性真菌症は、血液を含む体内各臓器に *Aspergillus* 属、*Candida* 属、*Cryptococcus* 属などの真菌が感染することによって生じる疾患で、内臓真菌症とも呼ばれる。我が国における深在性真菌症の中で、最も発生頻度が高いのは、アスペルギルス症 *aspergillosis*、カンジダ症 *candidiasis* であり、また発生率は低いがクリプトコッカス症 *cryptococcosis*、トリコスポロン症 *trichosporonosis*、接合菌症 *zygomycosis*（ムコール症 *mucormycosis*）も重要な疾患である。近年では、深在性真菌症の増加がみられるようになり、直接死因と結びつくことも多くなっている（病理解剖例中 4.6%）⁽³⁾。これには、白血病、悪性リンパ腫、固形がん、再生不良性貧血などの血液疾患に伴う免疫不全、抗がん剤使用による免疫能低下、臓器移植における免疫抑制剤の使用、AIDS により、コンプロマイズド・ホスト（*compromised host*）、すなわちハイリスク患者が増加したことが背景にある^(4, 5, 6)。

現在、本邦で深在性真菌症に対する適応が承認されている抗真菌剤としては、作用機序の分類で 4 クラス、あわせて 9 種の化合物が薬として市販されている（Table 0-1）。この数は抗菌剤と比較してはるかに少ない。このことは、真菌は細菌に比べると高度に分化した微生物であり、真核生物であるため細胞構造の点ではヒトを含めて脊椎動物と基本的には同じであることから、真菌に対する選択毒性の期待できる標的が極めて少ないことに起因している（Fig. 0-1）⁽⁷⁾。

現在、市販されている抗真菌剤でもっとも古いものとして、ポリエン系抗真菌剤に属する Amphotericin B（1962 年発売）がある。標的分子は、ヒトには存在しない真菌細胞膜のエルゴステロールであり、この分子と直接結合して細胞膜を破壊し真菌を死滅させる。殺菌力が高く、広い抗真菌スペクトルを有していることから今もなお多くの深在性真菌症治療におけるゴールドスタンダードとして重宝されている。しかしながら、その標的である真菌細胞膜のエルゴステロールのみならず、動物細胞のコレステロールとも結合することから安全域は狭く、腎毒性など重篤な副作用のリスクがあることが知られている⁽⁸⁾。このような毒性を軽減する目的とともに、パッシブターゲティングによる薬物動態改善による有効性増強も期待して、各種脂質担体制剤が開発され、一部は実用化されているが、なおも毒性面での課題は完全には解決されていない。また、薬価も高く、広く利用されるには至っていない⁽⁹⁾。1979 年には、核酸アナログである 5-FC（5-Fluorocytosine）が発売された。5-FC は、真菌の DNA 合成、タンパク質合成を阻害する^(10, 11)。Amphotericin B と比較して毒性が低く、経口剤として薬物動態は優れているが、その反面、適応症スペクトルが狭いうえに、耐性菌の出現頻度が高いため、本剤の臨床的有用性は限られたものとなっている。その後、真菌特異的に存在するエルゴステロールの生合成を阻害するアゾール系抗真菌剤である、Miconazole（1985 年）⁽¹²⁾、Fluconazole（1989 年）、Itraconazole（1993 年）⁽¹³⁾が発売された。これらの副作用は比較的少なく、とくに経口剤でもある Fluconazole の導入によるエンピリックセラピーあるいは予防的投与により、軽度の真菌症の治療や易感染性患者の予後は大きく改善された。アゾール系抗真菌剤は真菌のエルゴステロール合成酵素（14 α -steroldemethylase）を阻害して抗真菌作用を発揮するが、同時に、ヒトの薬物代謝酵素 P450 をも阻害してしまうことから、他の薬剤、とくに深在性真菌症のハイリスク患者で用いられることの多い抗癌剤や免疫抑制剤との併用する場合には血中濃度コントロールに注意が必要である。また、アスペルギルス症には無効である点、アゾール耐性 *Candida albicans* やアゾール系薬剤に対して感受性が低い *non-albicans Candida* が増大するという問題も生じている⁽¹⁴⁾。2002 年には、キャンディン系抗真菌剤である Micafungin が上市された⁽¹⁵⁾。キャンディン系抗真菌剤の最大の特徴は、その作用メカニズムにあり、真菌細胞壁の骨格多糖成分である β -1,3-glucan の合成酵素を特異的に阻害する。その結果、真菌は正常な細胞壁を構築できなくな

り、発育が停止するかまたは死滅する。ヒトなどの脊椎動物の細胞には、この β -1,3-glucan の合成系や多糖を含む細胞壁も存在しないので優れた選択毒性が発揮される。前述の Fluconazole が無効である *Aspergillus* 属、アゾール耐性 *Candida albicans*、*non-albicans Candida* 属に対しての薬効も有しており、重症患者で問題となる多くの真菌症に有効性が期待できることから、現在の真菌症治療に欠かせない治療薬となっている。また、2005 年には、*Aspergillus* 症にも有効な新規アゾール系抗真菌剤である Voriconazole⁽¹⁶⁾が、2012 年にはキャンディン系抗真菌剤で国内 2 番手となる Caspofungin⁽¹⁷⁾が上市され、深在性真菌症の治療における薬剤の選択肢の幅が広がった。

このように、1962 年の Amphotericin B の上市以降、抗真菌剤はめざましい進歩を遂げた。とくに 2000 年以降に上市された、Micafungin、Caspofungin、Voriconazole は、非常に優れた深在性真菌症治療薬であるが、一方でその殺菌性は Amphotericin B には及ばない。また、キャンディン系抗真菌剤ではクリプトコッカス症、トリコスポロン症、接合菌症の原因真菌への作用が弱い、Voriconazole では Fluconazole 同様の薬物相互作用の問題の他に、高頻度の視覚障害の副作用が現れる等の課題⁽¹⁸⁾が現在も残されている。いったん発症すると重篤な転機をたどる深在性真菌症において、さらに殺菌力を高めた、安全な抗真菌剤の開発が望まれている。

前述のように、真核生物である真菌は動物細胞と共通の細胞構造を有しており、安全性と抗真菌活性を両立しうる治療薬の標的分子が細菌と比べて少ない。その中で、細胞壁は動物細胞にはなく、かつ真菌の生存にとって必須な細胞構成要素であり、治療薬の標的として高い安全性と強い抗真菌作用が期待される⁽¹⁹⁾ (Fig. 0-2)。真菌細胞壁は主成分として β -1,3-glucan、 β -1,6-glucan、chitin、mannoprotein からなる⁽²⁰⁾。すでに臨床応用されているキャンディン系抗真菌剤は、その中で β -1,3-glucan 合成酵素を阻害し、*Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して治療薬効果を発揮することがわかっているものの、*Aspergillus* 属に対しては静菌的な作用にとどまり、 β -1,3-glucan 阻害のみでは *Aspergillus* 属に対して殺菌的に作用するには不十分であると考えられる。同じく細胞壁成分の一つである chitin の生合成酵素を阻害する化合物として Polyoxin⁽²¹⁾ や Nikkomycin 類⁽²²⁾が知られている。Polyoxin は農薬として実用化されており、また Nikkomycin

ZはMicafunginと併用することで*Aspergillus*属に相乗的に作用する事も示されている⁽²³⁾。このことから、 β -1,3-glucan 以外の真菌細胞壁を標的とする創薬の有用性が示唆されるものの、Polyoxin や Nikkomycin 類は代謝安定性や血中動態が悪いため臨床応用はされておらず、よりドラッグライクな化合物の創出が望まれている。一方で、これら代表的な細胞壁合成の阻害剤は、*Aspergillus* 属のような糸状菌に作用させると、その菌糸に特徴的な変形を誘導する事が知られている。例えば、Micafungin であれば菌糸の伸長が阻害され、短く分岐をした形態が見られ⁽²⁴⁾、Nikkomycin 類では菌糸の一部に球形に膨張した形態が見られる⁽²²⁾。

そこで本研究では、細胞壁合成阻害に基づく新規の抗真菌剤を開発する事を目的として、*Aspergillus fumigatus* の菌糸の形態変化に着目し、スクリーニングを実施した。自然界から単離したカビ、放線菌、バクテリアの培養液の有機溶媒抽出物（アセトン、メタノール等使用）を*Aspergillus fumigatus* に作用させ、その菌糸の形態変化を観察することで、新規な抗真菌物質KB425796-Aとそれを生産する*Paenibacillus* 属 530603 株を発見した。530603 株培養液から溶媒抽出法と液体クロマトグラフィー法によりKB425796-Aの白色粉末を単離し、HR-ESI-MS 分析、NMR 分析によりKB425796-Aの構造を12アミノ酸と脂肪酸側鎖からなる環状リポペプチドラクトン構造であると同定した。KB425796-Aの抗真菌スペクトルを調べたところ*Aspergillus* 属の他にMicafungin耐性真菌である*Cryptococcus* 属、*Trichosporon* 属、*Rhizopus* 属、*Pseudallescheria* 属に抗真菌活性を有することがわかった（第一章）。さらに、KB425796-AをMicafunginと併用し*Aspergillus fumigatus* に作用させることで、球形に膨張した特徴的な形態変化が見られることを発見し、それと同じ作用をもつ類縁体を530603株培養液から10種類単離しKB425796-B~Kを得た。これら類縁体の抗真菌活性評価を行ったところ、KB425796-CにおいてKB425796-Aより2倍強い抗*Aspergillus fumigatus* 活性が見られた。また、酵母遺伝子破壊株を用いた高感受性株スクリーニングの結果、mannoprotein 生合成の遺伝子欠損株がKB425796-C高感受性であることが示された（第二章）。さらにKB425796-Cとmicafunginの併用による抗*Aspergillus fumigatus* 活性を詳細に調べたところ、強力な相乗作用があることが示され、それぞれ単独の薬剤では静菌的な作用に留まるところが、併用することで殺菌作用が得られることが示された。*Aspergillus fumigatus* 全身感染マウスモデルにおいてもKB425796-Cは単剤で延命効果が得られ、

また Micafungin と併用することで薬剤濃度依存的に組織内の生菌数を下げる事でさらに長期の延命効果が得られることが示された。一方で、実験で示された有効性は 32 mg/kg と高用量であり、実用化のためにはさらなる類縁体探索や化学変換による potency の向上や体内動態の改善が必要と考えられた（第三章）。本論文では、以上の結果を踏まえて KB425796-C の深在性真菌症治療薬としての可能性と課題について論じる。

Table 0-1 日本で承認されている深在性真菌症治療薬⁽⁷⁾

薬剤クラス	一般名	商品名	投与形態	承認年
ポリエン	Amphotericin B (AMPH)	Fungizone	静脈注射	1962
ピリミジン	Flucytosine (5-FC)	Ancotil	経口	1979
アゾール	Miconazole (MCZ)	Florid F	静脈注射	1986
	Fluconazole (FLCZ)	Diflucan	経口	1989
			静脈注射	1989
	Itraconazole (ITCZ)	Itrizole	経口	1993
	Fosfluconazole (FFLZ)	Prodif	静脈注射	2004
	Voriconazole (VRCZ)	Vfend	静脈注射	2005
		Vfend	経口	2005
キャンデイン	Micafungin (MCFG)	Funguard	静脈注射	2002
	Caspofungin (CSFG)	Cancidas	静脈注射	2012

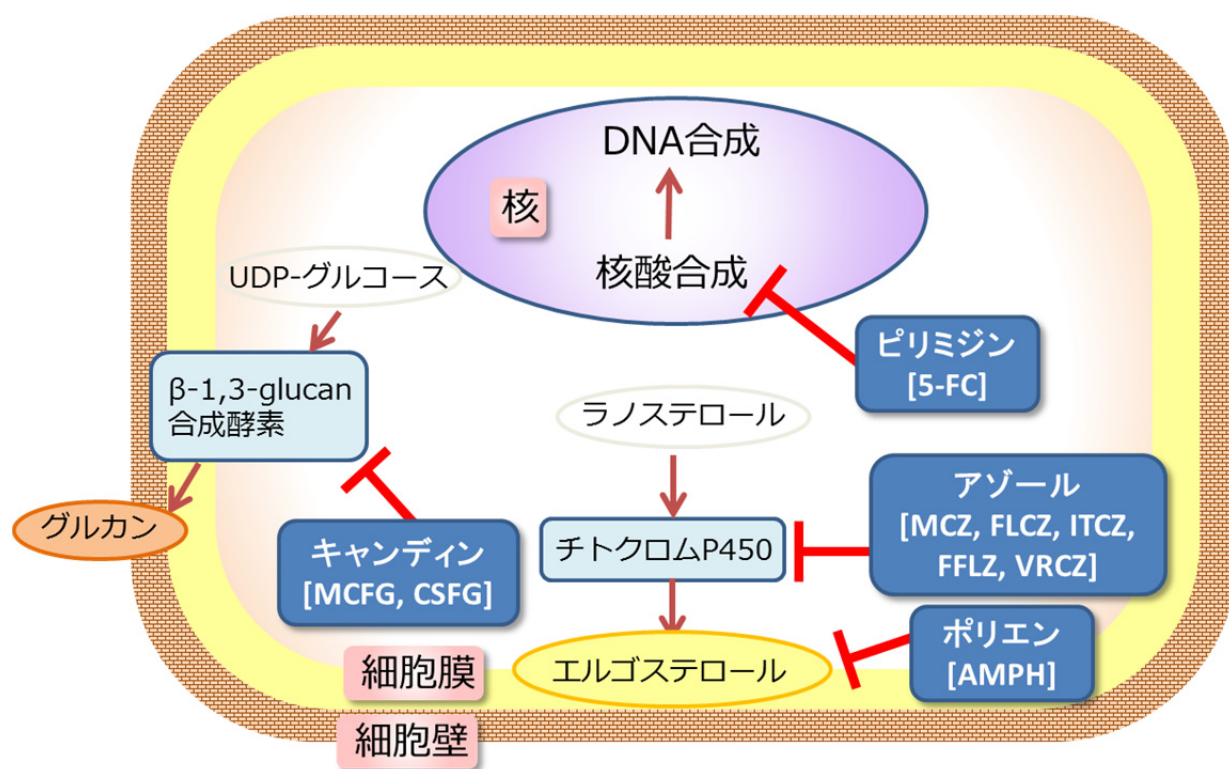


Fig. 0-1 抗真菌剤の治療標的

真菌細胞は動物細胞と共通の細胞構成成分が多く治療薬の標的となる分子が少ない。このため利用可能な薬剤の選択肢は限られる。Amphotericin BやFlucytosineは選択性が低く、毒性が強い。アゾール系薬剤により治療成績は改善されたが、薬物相互作用による併用禁忌の制限や薬剤耐性菌の出現頻度が高いなどの課題がある。MicafunginやCaspofunginといった細胞壁合成阻害剤は真菌に対する選択性が非常に高く、使いやすい薬として利用されている。各薬剤の略号は以下に示すとおりである。AMPH, Amphotericin B; 5-FC, Flucytosine; MCZ, Miconazole; FLCZ, Fluconazole; ITCZ, Itraconazole; FFLZ, Fosfluconazole; VRCZ, Voriconazole; MCFG, Micafungin; CSFG, Caspofungin

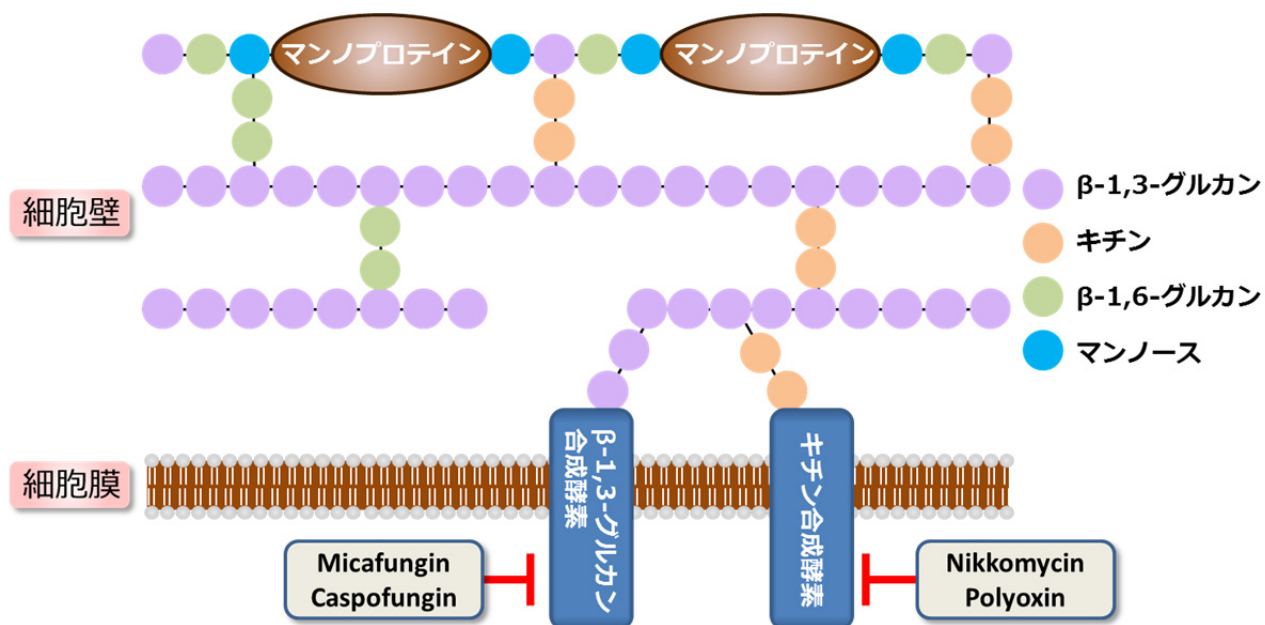


Fig. 0-2 真菌細胞壁の構造と細胞壁合成酵素阻害剤

真菌細胞壁の構造を模式的に表した。真菌細胞壁はおもに、 β -1,3-グルカン、 β -1,6-グルカン、キチン、マンノプロテインの4種類の構成成分からなり、Micafungin, Caspofungin は β -1,3-グルカン合成酵素複合体を阻害することで、Nikkomycin, Polyoxin はキチン合成酵素を阻害することで、真菌の生育を阻害する。細胞壁は、哺乳類細胞にはない真菌特有の構造であることから、高い選択性と有効性の両立が期待でき、 β -1,3-グルカン以外の細胞壁成分を阻害する薬剤は新規の深在性真菌症治療薬になり得ると期待できる。

第一章 新規抗真菌物質 KB425796-A の発見

Micafungin は旧藤沢薬品工業株式会社によって創製されたキャンディン系抗真菌剤であり、強い抗真菌活性と高い安全性から、現在臨床でその有用性が知られている⁽¹⁵⁾。しかし、その抗真菌スペクトラムは *C. albicans* には殺菌的に作用するが、*A. fumigatus* には静菌的なものであり、この点がアスペルギルス症に対する Micafungin の治癒率が不十分である事の一因と考えられている⁽²⁵⁾。

Micafungin は真菌細胞壁を構成する β -1,3-glucan の合成を阻害することで抗真菌活性を発揮するが、*A. fumigatus* 細胞壁には β -1,3-glucan の他に、chitin や mannoprotein など他の細胞壁構成成分が比較的多く存在するといわれており⁽²⁶⁾、キャンディン系薬剤が殺菌的に作用しない原因と考えられる。

本研究では、細胞壁合成阻害に基づいた抗真菌剤をスクリーニングするにあたり、既存の細胞壁合成阻害剤(Fig. 1-1)の中から β -1,3-glucan 合成阻害剤である Micafungin、chitin 合成阻害剤である Nikkomycin X⁽²²⁾、mannoprotein の構成要素の一つである glycosylphosphatidylinositol の阻害剤である Dactylfungin A⁽²⁷⁾の *A. fumigatus* 菌糸に対する作用を顕微鏡下で観察し比較検討した。つぎに自然界から単離したカビ、放線菌、バクテリアの培養液の有機溶媒抽出物（アセトン、メタノール等使用）を *A. fumigatus* に作用させ、その菌糸の形態変化を観察することで、既存の細胞壁合成阻害剤と類似する形態変化を誘導する新規物質をスクリーニングした。

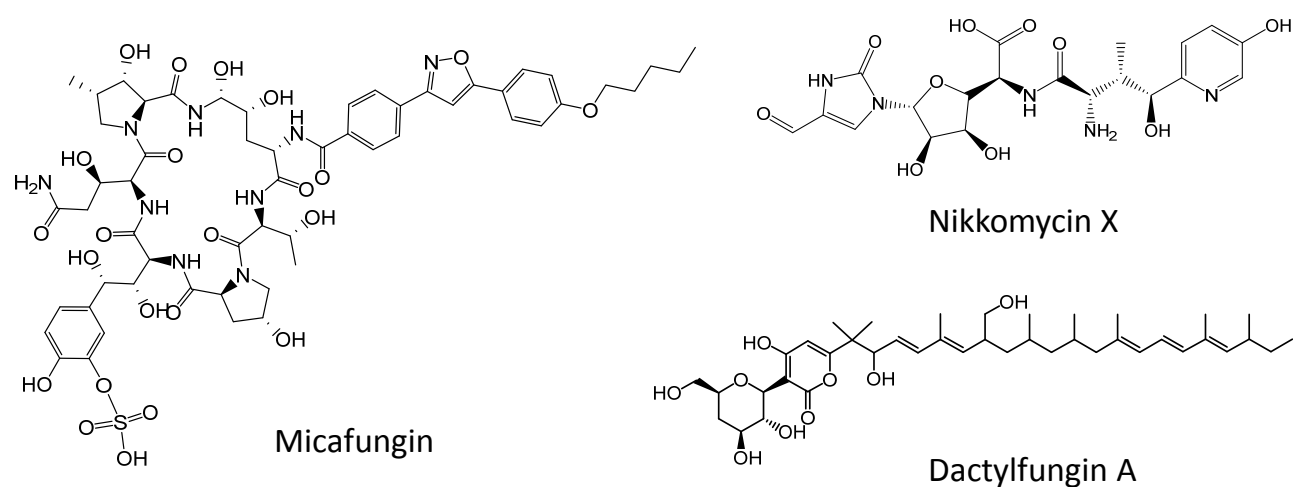


Fig. 1-1 既存の細胞壁合成阻害剤

材料及び方法

KB425796-A 生産菌の同定

KB425796-A 生産菌、530603 株は青森県十和田湖周辺土壌から希釈平板法により分離された。菌株は栄養寒天培地で 30℃、2 日間培養後 5℃で保存、培養源として使用した。分類学的研究は主に Bergey's manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. ⁽²⁸⁾に従った。16S rRNA 解析は村松らの方法⁽²⁹⁾に従った。インドール産生、炭素源からの生酸性試験はアピ 50CHB キット（シスメックス・バイオメリュー社）を使用した。生育温度は栄養寒天培地で 7 日間、5℃から 50℃まで 5℃刻みの生育を観察した。

KB425796-A 生産菌の培養方法

(1) フラスコ振とう培養

100 mL の培地：2% NB 培地(極東製薬工業)、0.1% ピルビン酸ナトリウム(ナカライテスク)を 500 mL 三角フラスコに分注し、120℃で 20 分間オートクレーブで滅菌した。この生産培地に、530603 株をブイヨン寒天培地から一白金耳接種し、30℃で 48 時間、振とう培養(200 回転／分)した。

(2) ジャーファーマンターによる通気攪拌培養

20 L の生産培地：3% MS3600(日本食品化工)、2% ペプトン(極東製薬工業)、1% CSL(日本食品化工)、0.05% アデカノール(旭電化)、0.05% シリコーン KM-70(信越化学)を 30 L 容ジャーファーマンターに注入後、120℃で 30 分間加圧滅菌した。この培地に(1)の種培養液を 0.5%(v/v) 加え、30℃で 4 日間培養した(通気量：20 L/分、攪拌速度 200 rpm)。

抗真菌物質の定量

培養液、および精製画分の抗真菌物質の定量は、生物学的検定と HPLC を併用した。HPLC 分析条件は、カラム：L-column ODS 250 mm×4.6 mm φ(化学物質評価研究機構)、移動相：アセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸(42：58：0.1)、流速：1 mL/min、検出：210 nm における吸

光度とした。

生物活性の測定方法

(1)菌液の調製方法

抗真菌アッセイには、臨床分離株 *Aspergillus fumigatus* FP1305、*Candida albicans* FP633、*Trichosporon asahii* FP2044、*Rhizopus oryzae* FP1988、*Pseudallescheria boydii* FP1987、*Cryptococcus neoformans* YC203 を用いた。*C. albicans*、*T. asahii*、*R. oryzae*、*P. boydii* は yeast malt extract(YM) 寒天斜面培地に一白金耳植菌し、37℃、24 時間静置培養した。これに滅菌生理食塩水を加え、白金耳を用いて菌体を懸濁したのち、ガーゼ濾過したものを微量液体培地希釈法に用いる菌液(孢子液)とした。*A. fumigatus* は potato dextrose agar(PDA)斜面培地に一白金耳植菌し、37℃、4 日間静置培養し、同様にガーゼ濾過したもの孢子液とした。*C. neoformans* は YM 液体培地に一白金耳植菌し 30℃、250 rpm、20 時間振とう培養し、ガーゼ濾過したのち滅菌生理食塩水で一回洗浄したものを菌液とした。

(2)微量液体培地希釈法

96 ウェル平板 microtiter plate(住友ベークライト)を使用した。培養培地には *C. albicans*、*T. asahii*、*R. oryzae*、*P. boydii*、*A. fumigatus* には RPMI1640 培地(Invitrogen)に等量の 330 mM MOPS バッファー(pH 7.0)を加えたものを用い、*C. neoformans* には yeast nitrogen base-glucose(YNBD) 培地を用いた。薬剤をあらかじめ microtiter plate 上で所定の培地にて 1 ウェル 50 μ L 分の 2 倍希釈系列を作製しておき、ここに菌液(孢子液)を、1 ウェルあたり 1×10^4 個となるように培地で希釈したものを 50 μ L ずつ接種した(最終菌量/最終液量/ウェル： 1×10^4 /100 μ L/ウェル)。この microtiter plate を 37℃で 20 時間(*C. albicans*、*T. asahii*、*R. oryzae*、*P. boydii*、*A. fumigatus*)または 48 時間(*C. neoformans*)静置培養し、培養終了後、顕微鏡にて試験菌の増殖および形態変化を観察し、最小有効濃度(MEC：minimum effective concentration)値を求めた。

(3)細胞増殖阻害活性の測定方法

選択毒性の指標として、マウス白血病細胞 EL-4 に対する細胞毒性を調べた。培地は 10% (v/v)Fetal bovine serum 添加 Eagle's minimum essential medium を用い、EL-4 細胞は、96 ウェル

microtiter plate に 1×10^4 cells/mL 100 μ L を分注した。検体は培養開始時に希釈して加え、5% CO_2 存在下、 37°C 、3 日間培養した。その後、顕微鏡にて細胞増殖の程度を観察した。同時に 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT)法による細胞毒性の測定も行った。測定には市販の MTT アッセイキット(フナコシ)を使用した。EL-4 は、3 日ないし 4 日ごとに継代培養したものをを用いた。

物理化学的分析

マスマススペクトルは LCMS-IT-TOF spectrometer LCMS8050(島津)、比旋光度は SEPA-500 polarimeter(堀場製作所)、赤外スペクトルは Spectrum 65 FT-IR spectrometer(PerkinElmer)、 ^1H (500MHz)NMR スペクトルおよび ^{13}C (125MHz)NMR スペクトルは AVANCE 500 spectrometer(Bruker)(測定溶媒： CD_3OH)を用いた。1 次元(^1H , ^{13}C , DEPT(Distortion less Enhancement by Polarization transfer))及び 2 次元(COSY(CORrelated SpectroscopY), TOCSY(Total Correlation SpectroscopY), HSQC(Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation), ROESY(Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)を測定し、解析に用いた。COSY は H-H スピンカップリングを検出することを目的として、TOCSY は磁化移動が起こる範囲の H-H スピン系列を検出することを目的として、HSQC は直結する C-H を検出することを目的として、HMBC は C-H ロングレンジカップリングを検出することを目的として、ROE は回転座標系におけるオーバーハウザー効果(概ね 4 オングストローム以内のプロトン同士に相関が見られる)を検出することを目的として、それぞれ測定し、解析に用いた。サンプルは 1 mg~10 mg の化合物を 0.6 mL の CD_3OH に溶解し、測定時間は COSY および TOCSY 測定では 20 分~1 時間 30 分、HSQC 測定では 1~2 時間、HMBC 測定では 2~10 時間、 ^{13}C NMR では 2~24 時間測定した。2 次元 NMR は取り込み時間および展開時間に対してフーリエ変換を行い、それぞれ F_2 軸および F_1 軸とした。

結果

既存の真菌細胞壁合成阻害剤による *A. fumigatus* 菌糸の形態変化

Micafungin 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、Nikkomycin X 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 、Dactylfungin A 1.3 $\mu\text{g/mL}$ を *A. fumigatus* 胞子を含む培地に添加し、20 時間培養した際の *A. fumigatus* 菌糸の形態を観察した(Fig. 1-2 a-d)。後述の新規物質 KB425796-A による形態も併記した(Fig. 1-2e)。

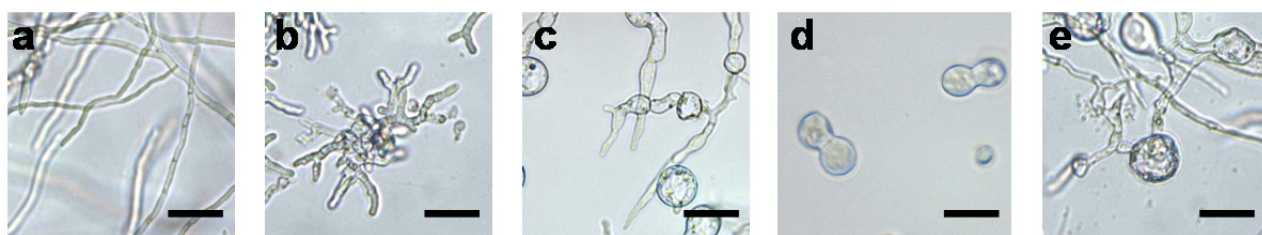


Fig. 1-2 抗真菌剤により誘導される *A. fumigatus* 菌糸の形態変化

a) Control, b) Micafungin 0.5 $\mu\text{g/ml}$, c) Nikkomycin X 6.3 $\mu\text{g/ml}$, d) Dactylfungin A 1.3 $\mu\text{g/ml}$, e) KB425796-A 3.1 $\mu\text{g/ml}$, Scale bar, 100 μm .

スクリーニング

カビ 31521 検体、放線菌 15420 検体、バクテリア 5984 検体の培養液の有機溶媒抽出物（アセトン、メタノール等使用）を用いて *A. fumigatus* 菌糸の形態変化を指標にスクリーニングを行い、Fig. 1-2 に示した細胞壁合成阻害剤と類似の形態変化を示すサンプルを選別した。選別したサンプルについて LC-MS 分析を行い、既知抗真菌物質を含有するサンプルについて除外した(デレプリケーション)結果、新規物質 KB425796-A(Fig. 1-3)を生産するバクテリア 530603 株を見出した(Fig. 1-2 e)。

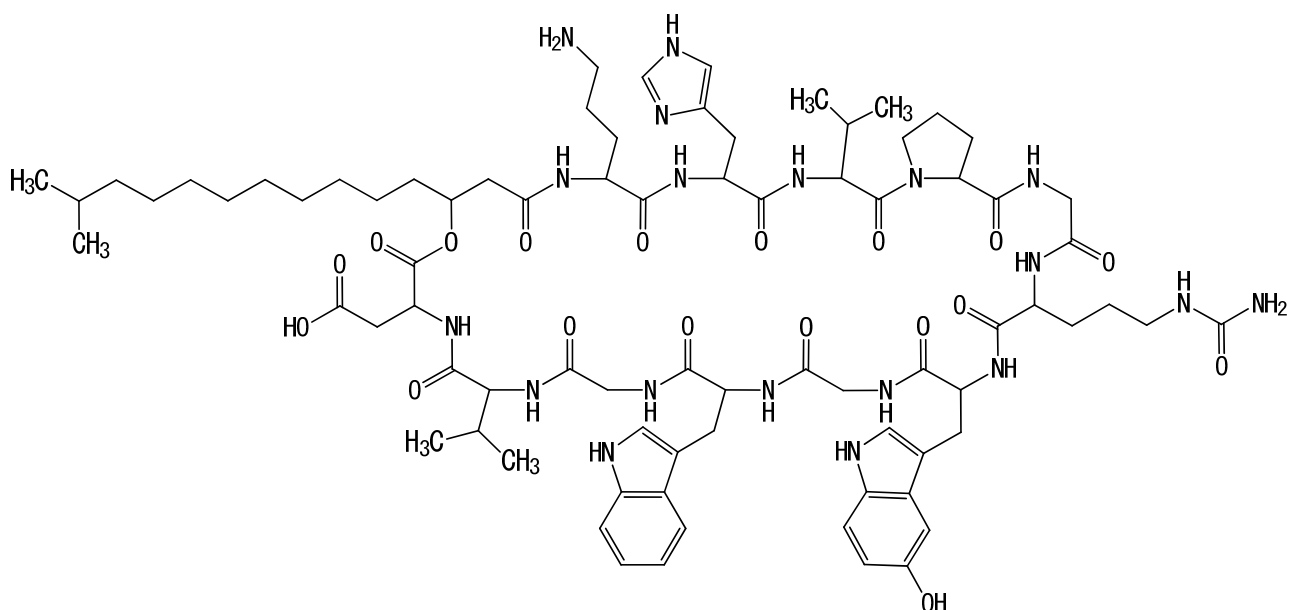


Fig. 1-3 KB425796-A の構造

KB425796-A 生産菌 530603 株の同定

530603 株の培養上の特徴および形態学的な特徴は Table 1-1 にまとめた。細胞はグラム陽性、桿菌、単一または短鎖状で、細胞末端に内生孢子を形成した。Luria-Bertani (LB) 寒天培地、30℃、3 日間培養後のコロニーは直径 7 mm、半透明、低い凸面隆起の不規則状、光沢有り、円滑表面、周囲は一続きであった。セルサイズは $0.5\text{-}0.8 \times 2.5\text{-}15 \mu\text{m}$ 、好気性、ただし嫌気条件下でもわずかに生育、運動性有り、膨張孢子嚢の中に内生孢子を形成、孢子形成の位置は末端部、孢子の形は卵型～円筒型、孢子のサイズは $0.5\text{-}1.2 \times 1.5\text{-}2.5 \mu\text{m}$ であった。オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性、グルコース、アラビノースからの生酸性は陽性、生育温度範囲は 10-45℃ (30-35℃至適) であった。16S ribosomal RNA 遺伝子全長解析の結果、*Paenibacillus* 属と 99.0%以上の相同値を示した。16S ribosomal RNA 遺伝子全長配列をもとに、Neighbor-joining 法による系統樹を作成した結果、530603 株は基準となる *Paenibacillus* 属の各種と非常に近縁の種であることが示された(Fig. 1-4)。上記の形態、生理的性質も同属の性質と一致しており、本菌株は *Paenibacillus* 属に属すると考えられた。530603 株の 16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列は、*Paenibacillus dendritiformus*⁽³⁰⁾ の塩基配列と最も高い相同性(99.85%)を示した。そこで 530603 の種を決定するために、基準株 T168T 株(BGSC 30A1)を取り寄せて比較対照試験を行った。本菌株の主要特徴である tip-splitting 型や chiral 型コロニー形態は 530603 株では観察出来なかった。

この他にもセルサイズ、孢子形成位置、食塩耐性、炭素源の生酸性など異なる点がみられた。以上の結果から、本菌株が *Paenibacillus* 属の新種である可能性が示唆されるものの、新種と決定するには今後さらに詳細な研究が必要である。本菌株は *Paenibacillus* sp. 530603 と命名し、FERM BP-10803 として産業技術総合研究所、特許生物寄託センターに寄託した。本菌株の 16S ribosomal RNA 遺伝子配列は accession number AB746175 として GenBank/EMBL/DDBJ に登録した。

Table 1-1 530603 株と *Paenibacillus dendritiformis* T168T 株の比較

Characteristic	Strain 530603	<i>P. dendritiformis</i> T168T
Cell size (μm)	0.5-0.8 by 2.5-15	0.5-1.0 by 2.0-3.0
Branch pattern formation		
on peptone agar	-	+
Spore shape	oval	oval
Spore position	terminal	subterminal or terminal
Swollen sporangia	+	+
Anaerobic growth	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Production of:		
Indole	-	+
Voges-Proskauer test	-	+
Hydrolysis of:		
Casein	+	+
Starch	+	+
Acid production from:		
Glucose	+	+
Arabinose	+	-
Mannitol	-	-
Xylose	-	-
45 °C	+	+
65 °C	-	-
pH 5.7	+	+
5% NaCl	+	+
7% NaCl	-	+

+, positive; -, negative

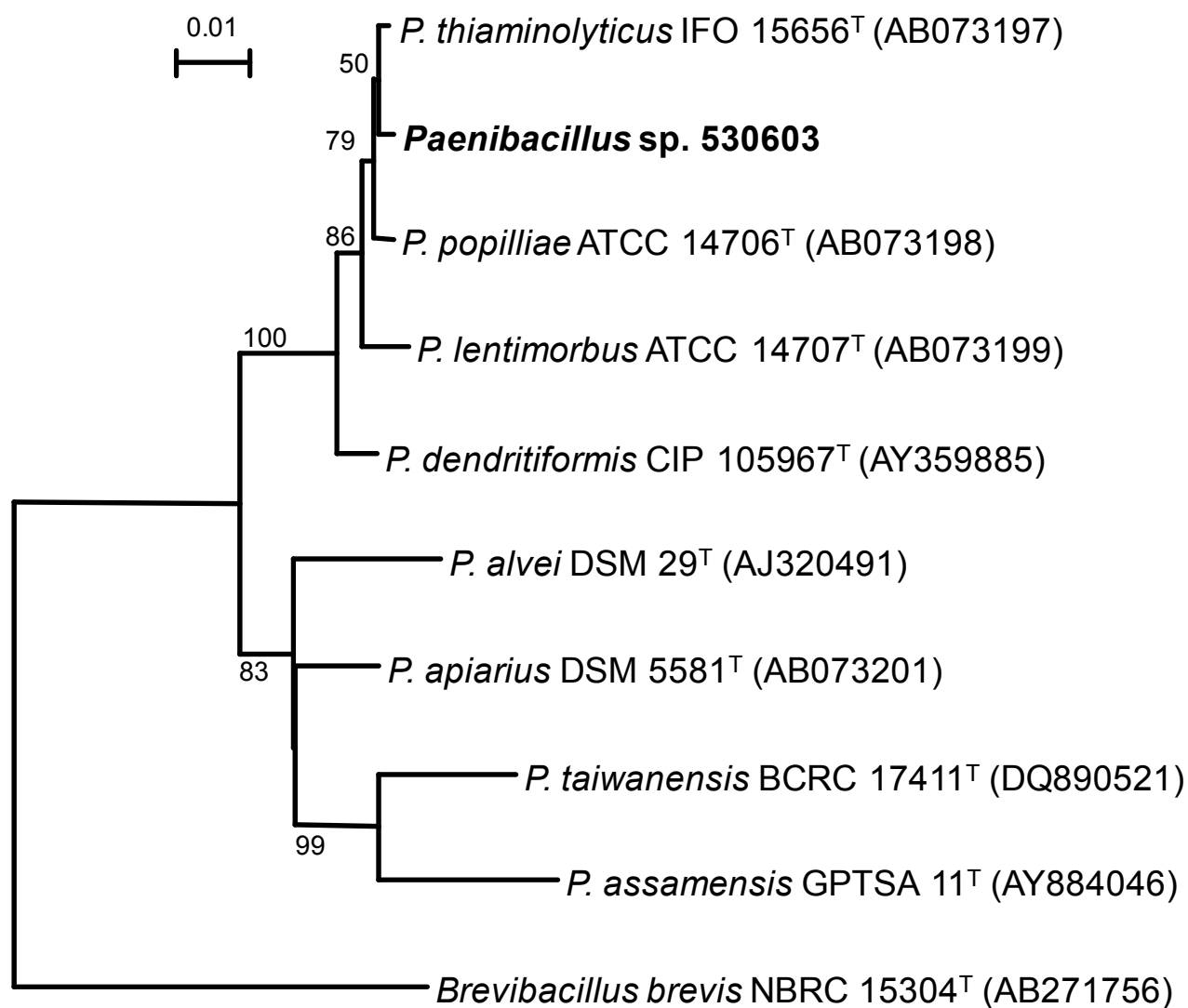


Fig. 1-4 530603 株の系統樹解析

530603 株の 16S rRNA 塩基配列を用いて相同性検索を行い、近縁菌種と Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。1000 回のブートストラップ検定を行いブートストラップ値が 50% 以上の分枝にはその値を記した。0.01 で示したスケールは 1 塩基置換あたりの枝長を表す。

530603 株の培養

530603 株をジャーファーマンターによる通気攪拌培養系で培養した際の、培養液中の KB-425796-A の生産量を HPLC 分析により経時的に測定した(Fig. 1-5)。その結果、培養開始 80 時間後に生産量はピークである 120 $\mu\text{g/mL}$ に達し、その後減少傾向が認められたため、90 時間で培養を中止し、培養液を単離精製プロセスに供した。

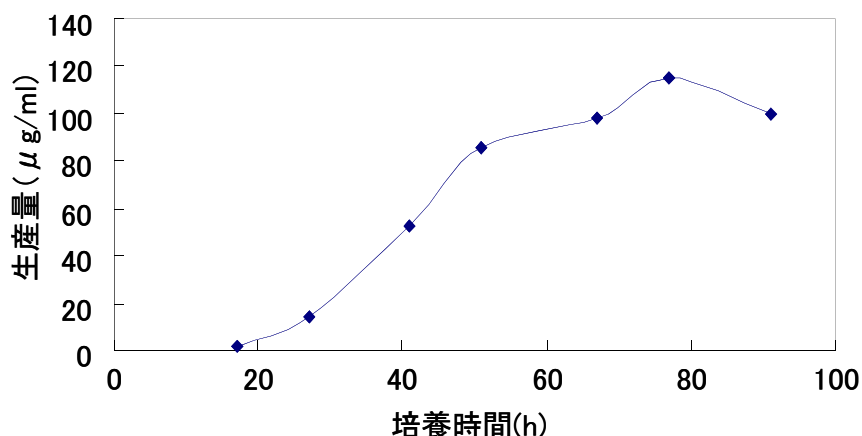


Fig. 1-5 KB425796-A 生産量の経時的変化

KB425796-A の単離・精製

KB425796-A の単離・精製は以下のように行った。まず、培養液に等量のアセトンを加え、抽出液に濾過助剤ラヂオライト #600 およびラヂオライトデラックス W50(昭和化学)を適量加え、フィルタープレスを用いて濾過した。得られた濾液に等量の蒸留水を加え、水で平衡化した DIAION HP-20(5 L ; 三菱化学)に通液、吸着させ、15 L の水で洗浄し、続いて 15 L の 50%メタノール水で洗浄した。その後、100%メタノール 17 L で溶出させた。この溶出液に等量の水を加えて希釈した後、水で平衡化した 2 L の Daisogel SP-120-ODS-B(15/30 μm ; DAISO)カラムに通液、吸着させ、5 L の蒸留水で洗浄した。そして、0.1%トリフルオロ酢酸を含む 45%アセトニトリル水 4.5 L で溶出を行った。得られたフラクションのうち KB425796-A の純度の高いフラクションを再度同様にカラムに通液、吸着させ、5 L の蒸留水で洗浄した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む 42%アセトニトリル水 5 L で溶出を行った。得られたフラクションのうち KB425796-A の純度の高いフラクションを再度同様にカラムに通液、吸着させ、5 L の蒸留水で

洗浄した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む 40%アセトニトリル水 5 L で溶出を行った。高純度の KB425796-A が含まれた 1.5 L-3.5 L にかけての溶出フラクションを水で平衡化した 0.2 L の Daisogel SP-120-ODS-B(15/30 μm ; DAISO)カラムに通液、吸着させ、1 L の蒸留水で洗浄後、0.2 L の 100%メタノールで溶出した。得られた溶出液を減圧濃縮・乾固し、1.62 g の粉末を得た。得られた粉末を 2 mL の 100%メタノールに溶解し、クロロホルムで平衡化した 50 mL の silica gel 60(40/50 μm ; 関東化学)カラムに上層した。150 mL のクロロホルム-メタノール混合液(クロロホルム：メタノール=10：1)で溶出し、高純度の KB425796-A を含むフラクションを減圧濃縮・乾固し、1.5 g の KB425796-A 白色粉末を得た。

KB425796-A の物理化学的性質および構造解析

KB425796-A の物理化学的性質を Table 1-2 に示す。KB425796-A はメタノール、ジメチルスルホキシドに易溶、クロロホルム、アセトンに僅かに可溶、水、酢酸エチルには不溶の無色無定形粉末で、硫酸セリウム、ヨウ素、ニンヒドリンの各反応によって呈色した。UV 吸収は 280 nm および 290 nm で極大であった。KB425796-A は HR-ESI-MS 分析において、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ のピークが m/z 1618.8745 Da に、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ のピークが m/z 1616.8600 Da に得られたことから、分子式 $\text{C}_{79}\text{H}_{115}\text{N}_{19}\text{O}_{18}$ (理論値； $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1618.8740 Da, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1616.8595 Da)であると同定した。この分子式は後述する NMR データとも一致した。

Table 1-2 KB425796-A の物理化学的性質

Appearance	White powder
Specific rotation $[\alpha]_D^{23}$	-20.1 (c0.5, MeOH)
HR-LC-MS (m/z)	
Found (m/z)	1618.8745 [M+H] ⁺ , 1616.8600 [M-H] ⁻
Calcd (m/z)	1618.8740 [M+H] ⁺ , 1616.8595 [M-H] ⁻
Molecular formula	C ₇₉ H ₁₁₅ N ₁₉ O ₁₈
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ)	290(10700), 280(12900)
Color test	
Positive	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin
Negative	Molish, Dragendorff, FeCl ₃
Solubility	
Soluble	methanol, DMSO
Insoluble	H ₂ O, EtOAc
IR λ_{\max} (KBr) cm ⁻¹	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1200
TLC (R _f value)*	0.45

*Silica gel 60 NH2 F254s (MERCK):methanol-chloroform (1:1)

Fig. 1-6 に示す通り、標準アミノ酸(Orn(*a*), His(*b*), Val(*c*), Pro(*d*), Gly(*e*), Gly(*h*), Trp(*i*), Gly(*j*), Val(*k*))の帰属は常法に則って行った。また、1次元 NMR 解析(¹H, ¹³C, DEPT)に加えて2次元 NMR 解析(COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY)から非標準アミノ酸(Cit(*f*), 5-hydroxytryptophan(HOTrp(*g*), acyl 側鎖(*m*))の存在を明らかにした。Cit(*f*): COSY および TOCSY 解析から KB425796-A が Orn と類似したスピン系を有する事が示され、末端の窒素に近接した methylene proton(δ_H 2.90, 2.84)が carbonyl 基(δ_C 162.3)と HMBC 相関を示したことから ureido 基が想起された。さらに-NH₂(δ_H 5.45(2H, br s))および-NH(δ_H 5.90(1H, br t))間の ROE 相関が ureido 基の存在を支持した。ureido 基の存在と Orn 類似アミノ酸の存在から、サブユニット(*f*)は citrulline と同定された。HOTrp(*g*): 10.13 p.p.m.の NH シグナルの低磁場シフトは Trp(*i*)の indole-NH によるものであった。もう一つの 10.08 p.p.m.の低磁場 NH シグナルは Trp 類似のアミノ酸の存在を示唆した。3つ benzen プロトンシグナル(δ_H 7.18(d, J=8.5 Hz) 7.03(d, J=1.5 Hz) 6.78(dd, J=8.5, 1.5 Hz))から、このアミノ酸は 5-hydroxytryptophan または 6-hydroxytryptophan であると示唆された。 β -CH₂ (δ_H 3.47) と benzene シグナル(δ_H 7.03)の ROE 相関からサブユニット(*g*)は 5-hydroxytryptophan と同定された。Acyl 側鎖(*m*): COSY, HSQC, HMBC 解析から 2-methylpropyl および 3-hydroxybutyryl の存在が示された。 δ_H 1.30-1.20 に見られる 7つの脂肪族

メチレンピーク (δ_C 30.9(t), 30.7(t), 30.6(t), 30.5(t), 30.4(t), 28.5(t), 27.0(t)) および前述の 2-methylpropyl、3-hydroxybutyryl の存在をあわせることでサブユニット *m* は 3-hydroxy-13-methylmyristoyl と同定された。上述の 12 アミノ酸とアシル側鎖により、Fig. 1-3 に示されるすべての原子が占められる一方、分子式から必要とされる不飽和度 32 に対して 31 が占められることから、本化合物は環状構造をとると考えられた。

HMBC 相関 (Fig. 1-7) の検討より、サブユニット *a-m* は 2 つのフラグメント (acyl(*m*)-Orn(*a*)-His(*b*)-Val(*c*)-および-Gly(*e*)-Cit(*f*)-OHTrp(*g*)-Gly(*h*)-Trp(*i*)-Gly(*j*)-Val(*k*)-Asp(*l*)-) に組み立てられた。ROE の結果からもこの推定配列が支持された。さらに ROE における Val(*c*) α H(δ_H 4.30) と Pro(*d*) δ -CH₂(δ_H 3.60) の距離、および Pro(*d*) α H(δ_H 4.32) と Gly(*e*)NH(δ_H 7.33) の距離から、-Val(*c*)-Pro(*d*)-Gly(*e*)配列の存在が示された。ROE の結果から Fig. 1-7 全体の配列を組み立てることができた。サブユニット(*m*)の C-3 の ¹H および ¹³C ケミカルシフト(δ_H 5.08, δ_C 72.8)は acyloxymethine の特徴である。H-3(*m*)と Asp(*l*) carbonyl の HMBC 相関から macrocyclic lactone 構造が同定された。以上の解析から KB425796-A の構造を Fig. 1-3 のように決定した。

KB425796-A の ¹H および ¹³C NMR のチャートを Fig. 1-8 および Fig. 1-9 に、¹H-¹H COSY チャートを Fig. 1-10 に、TOCSY チャートを Fig. 1-11 に、ROESY チャートを Fig. 1-12 に、HSQC チャートを Fig. 1-13 に、HMBC チャートを Fig. 1-14 に、¹H および ¹³C NMR シグナルの帰属を Table 1-3 に示す。

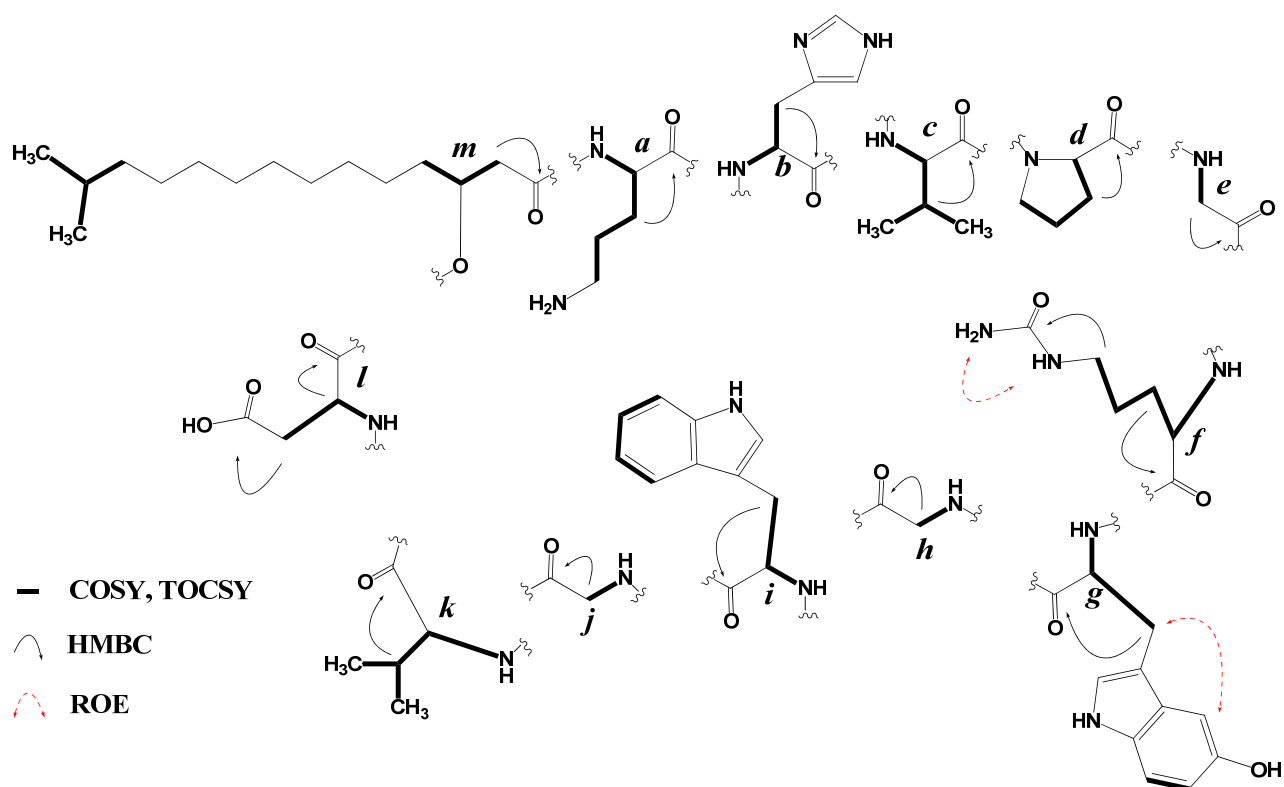


Fig. 1-6 KB425796-A の *a*~*m* サブユニット解析

HMBC は矢印の始点(^1H)から終点(^{13}C)にロングレンジカップリングがあることを表す。ROE は矢印間の ^1H が概ね 4 Å 以内であることを表す。スペクトルデータは Fig. 1-10~14 参照。

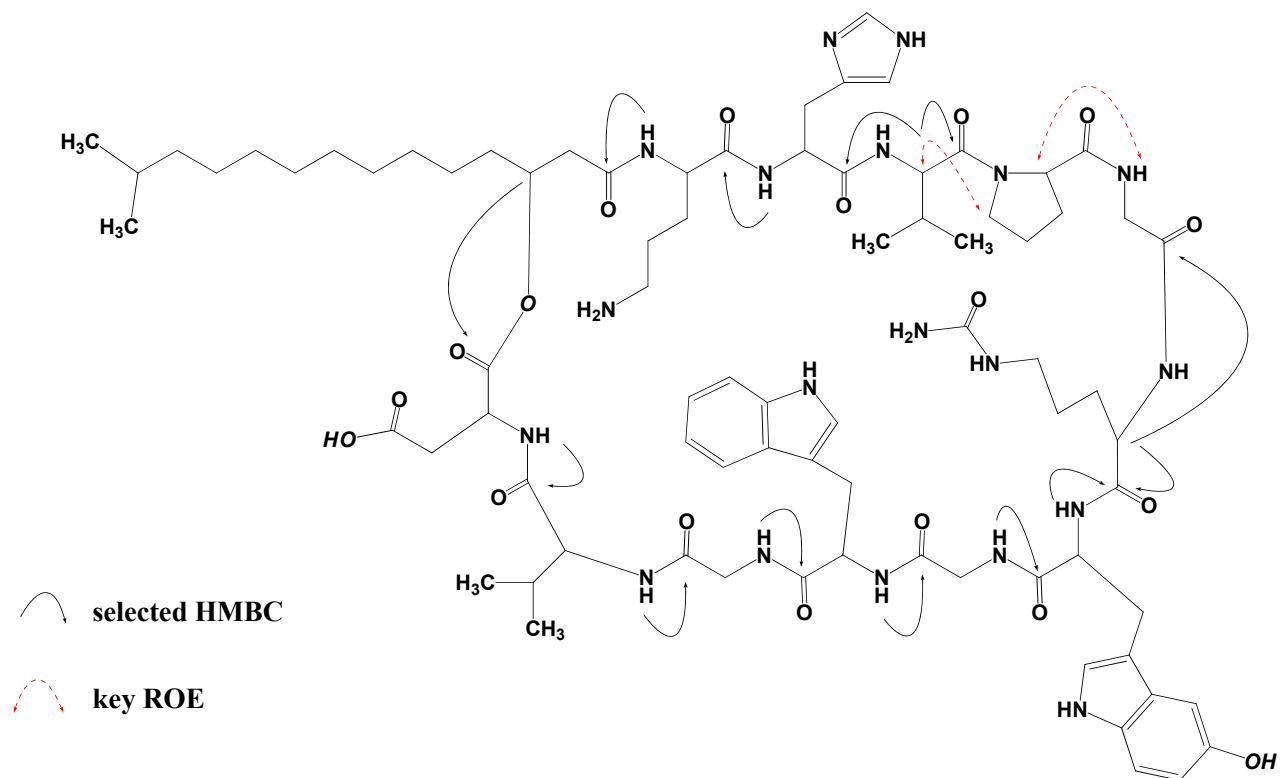


Fig. 1-7 KB425796-A の HMBC および ROE によるサブユニット配列の解析

スペクトルデータは Fig. 1-12,14 参照。

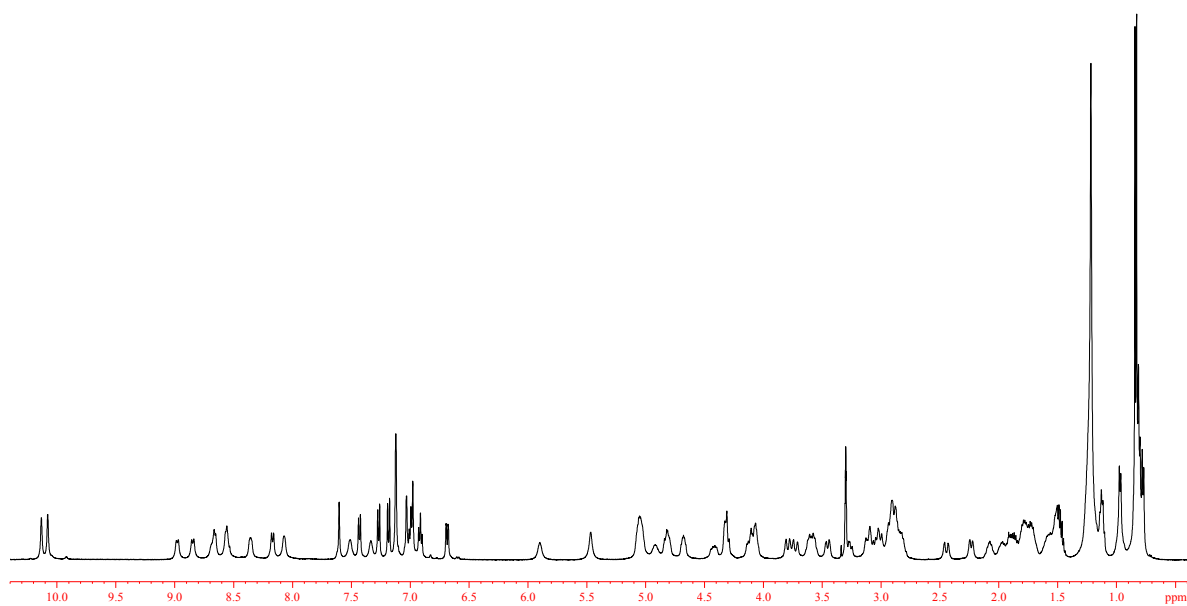


Fig. 1-8 KB4225796-A の ^1H NMR スペクトル

測定条件については本文実験条件参照、各ピークのアサインメントは Table1-3 に記載した。

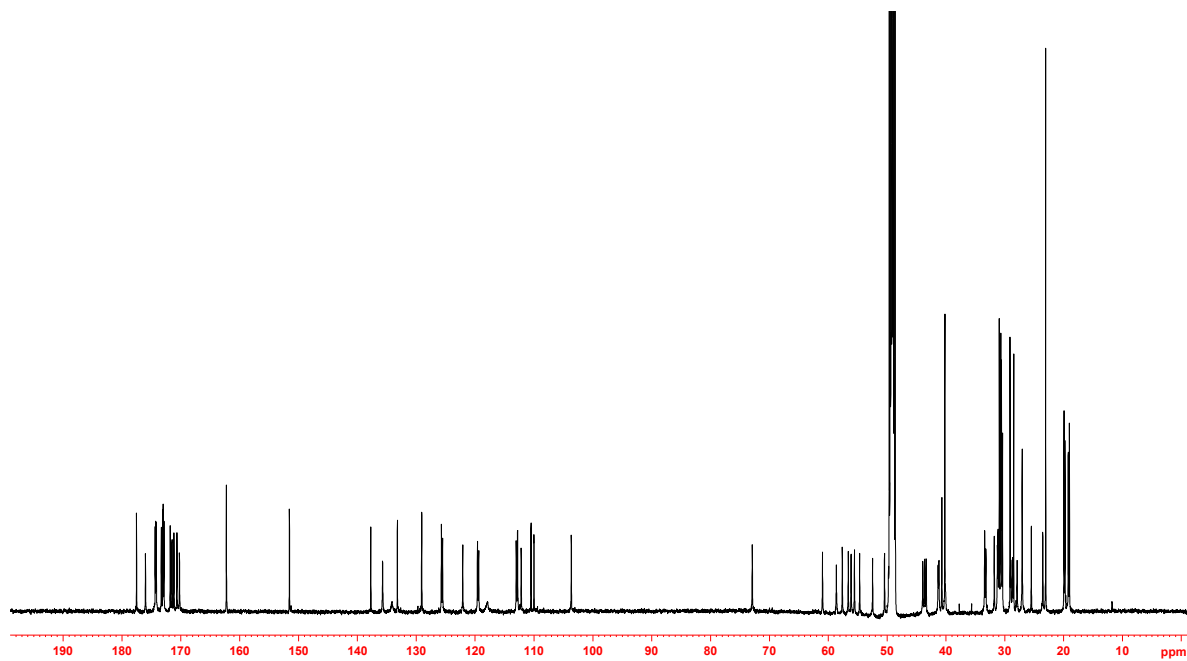


Fig. 1-9 KB4225796-A の ^{13}C NMR スペクトル

測定条件については本文実験条件参照、各ピークのアサインメントは Table1-3 に記載した。

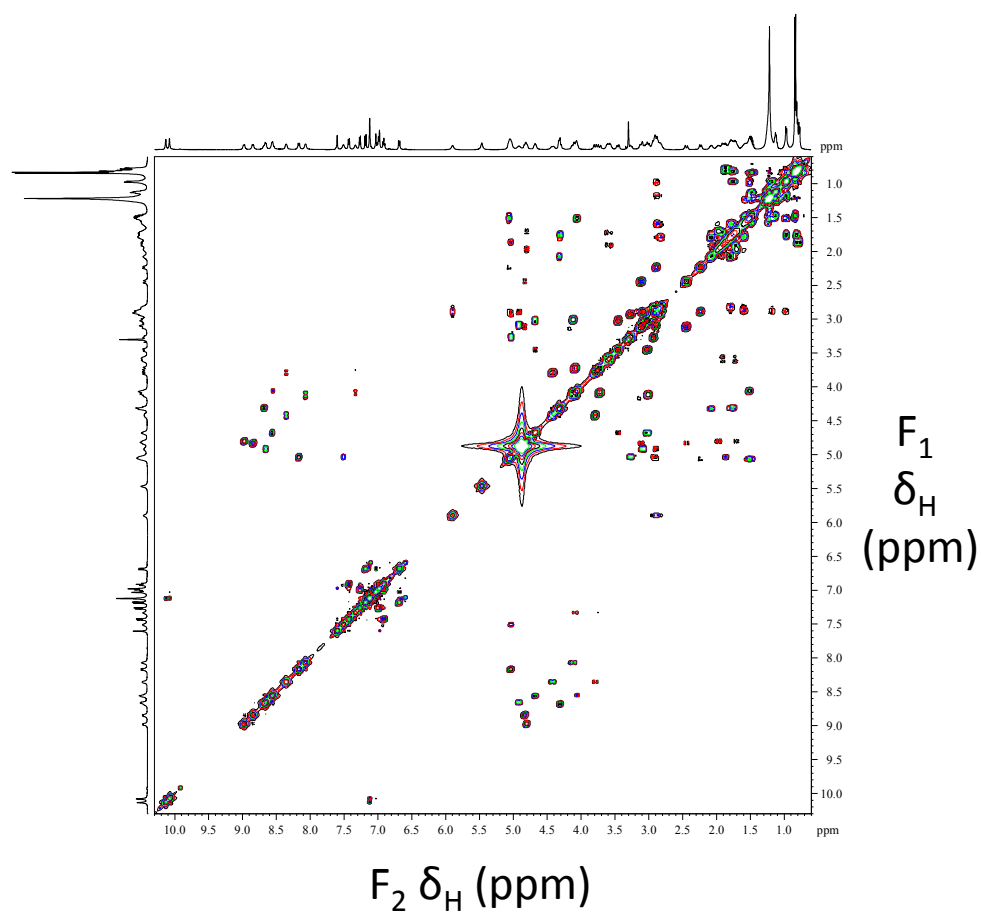


Fig. 1-10 KB4225796-A の ^1H - ^1H COSY 解析

測定条件については本文実験条件参照、本解析により得た ^1H の相関を Fig. 1-6 に記載した。

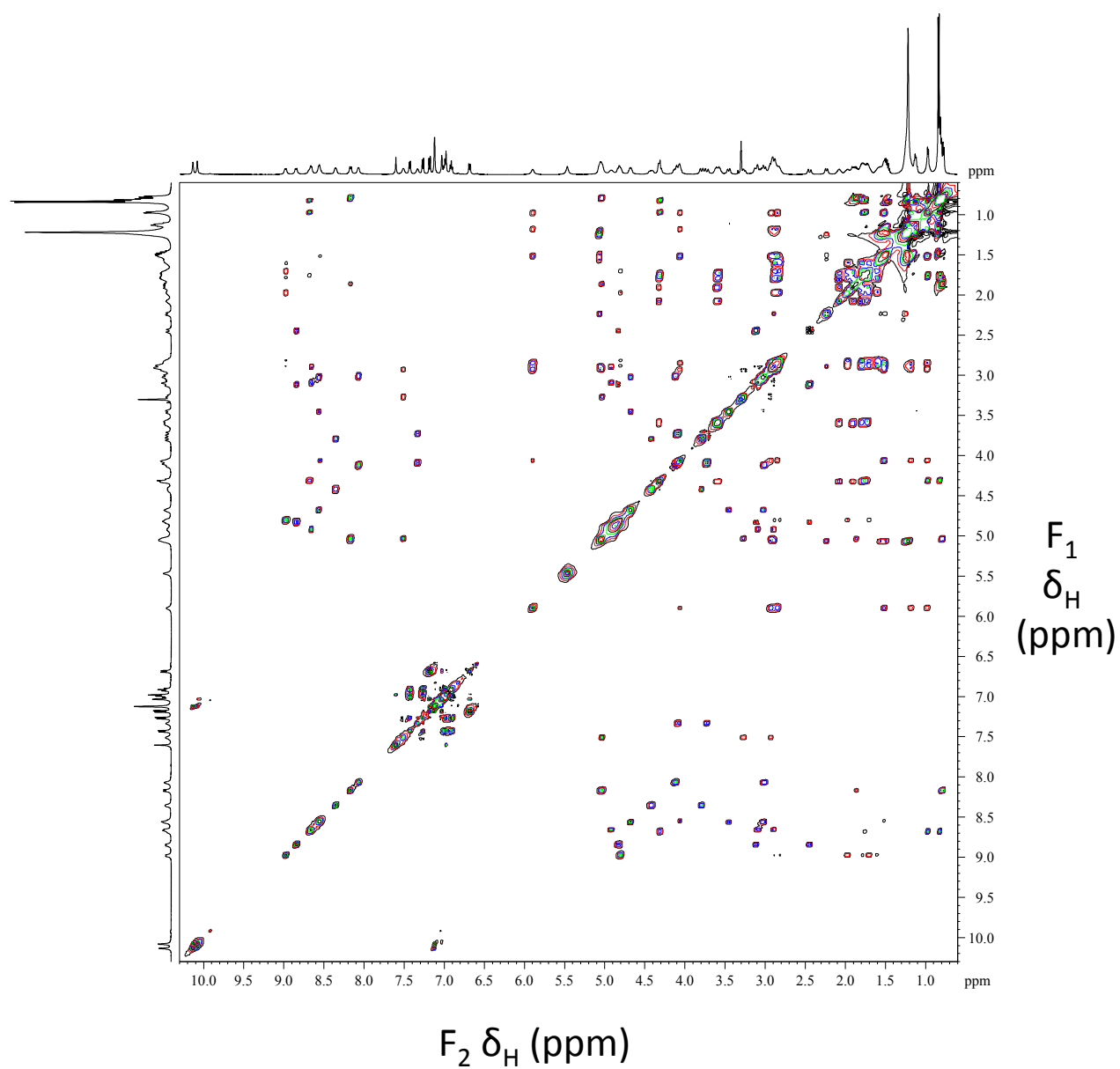


Fig. 1-11 KB4225796-A の TOCSY 解析

測定条件については本文実験条件参照、本解析により得た ^1H の相関を Fig. 1-6 に記載した。

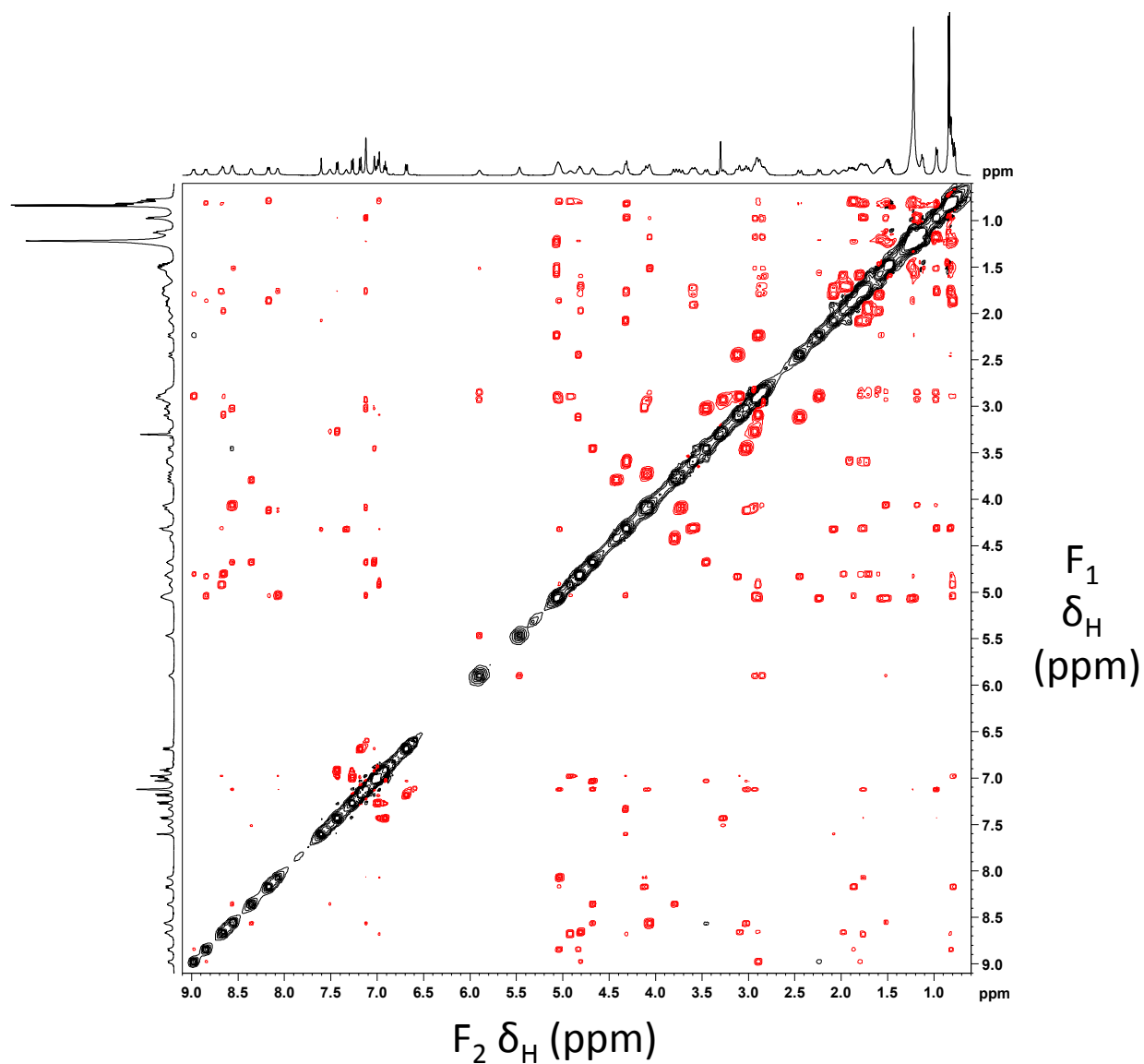


Fig. 1-12 KB4225796-A の ROESY 解析

測定条件については本文実験条件参照、本解析により得た ^1H の相関を Fig. 1-6、Fig. 1-7 に記載した。

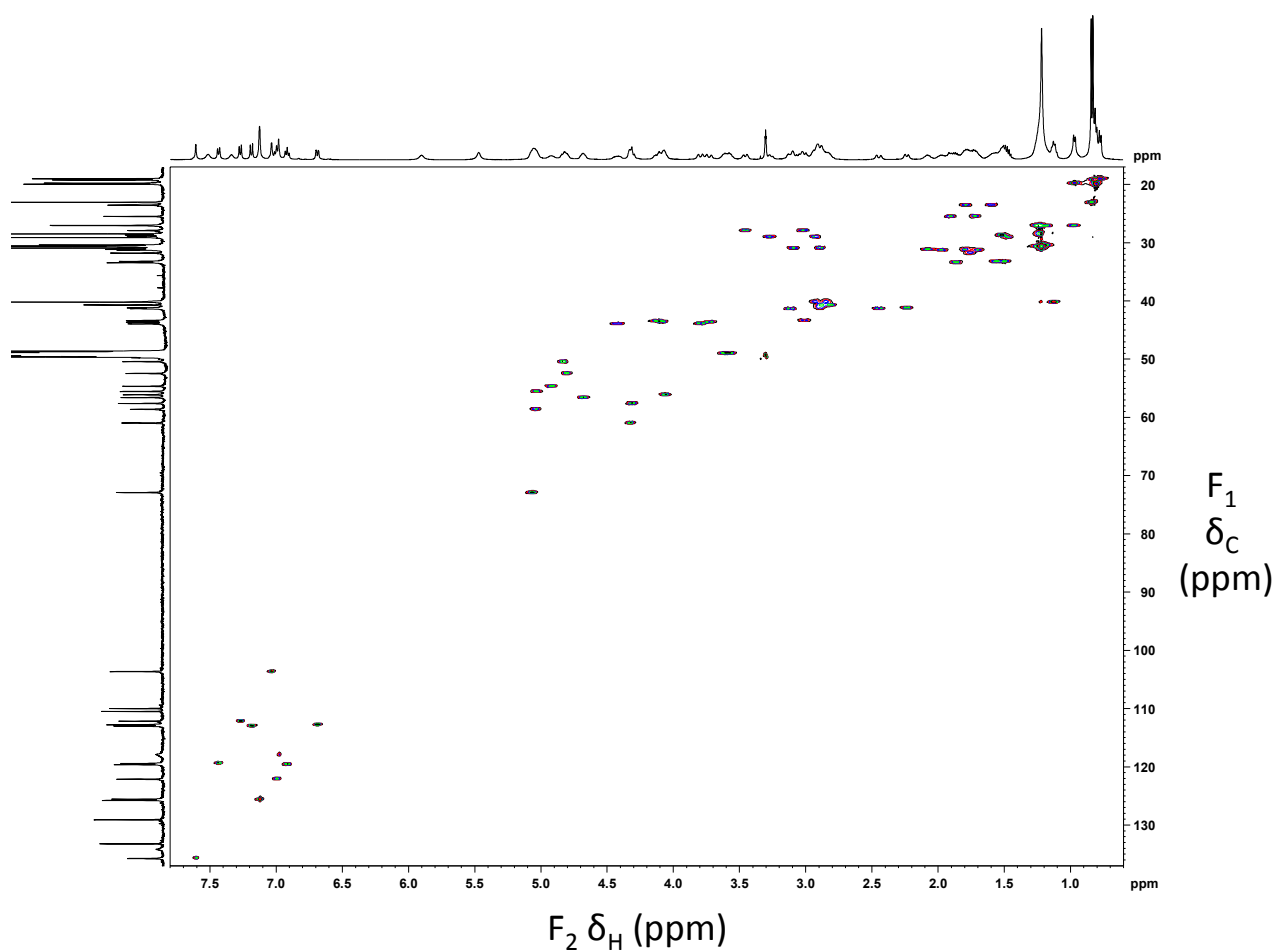


Fig. 1-13 KB4225796-A の HSQC 解析

測定条件については本文実験条件参照。

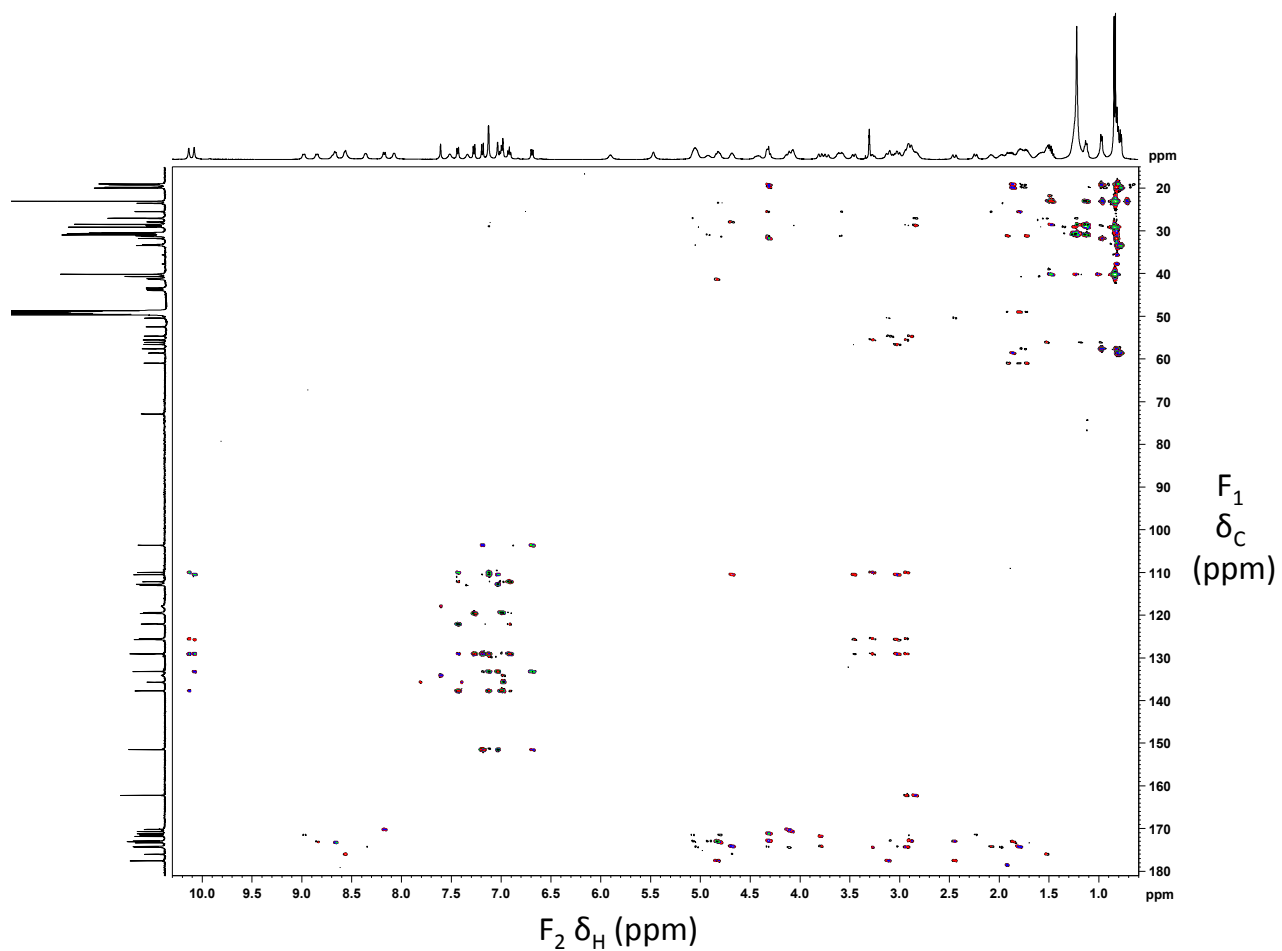


Fig. 1-14 KB4225796-A の HMBC 解析

測定条件については本文実験条件参照、本解析により得た ^1H 、 ^{13}C の相関を Fig. 1-6、Fig. 1-7 に記載した。

Table 1-3 KB425796-A の ^1H (500 MHz) NMR データおよび ^{13}C (125MHz) NMR データにおけるアサインメント

position	$\delta_{\text{C}}(\text{m})$	δ_{H}	position	$\delta_{\text{C}}(\text{m})$	δ_{H}
Orn (a)			Gly (h)		
NH		8.97	NH		8.37
α	52.5 (d)	4.80	α	43.9 (t)	4.43, 3.80
β	31.3 (t)	1.98, 1.72	CO	171.8 (s)	
γ	23.5 (t)	1.78, 1.55			
δ	40.7 (t)	2.90, 2.80	Trp (i)		
CO	173.3 (s)		NH		7.49
His (b)			α	55.6 (d)	5.03
NH		8.66	β	29.0 (t)	3.28, 2.91
α	54.7 (d)	4.91	NH		10.13
β	30.9 (t)	3.07, 2.88	2	125.5 (d)	7.13
2	135.7 (d)	7.63	3	110.0 (s)	
4	118.0 (d)	6.99	4	119.4 (d)	7.45
5	134.2 (s)		5	119.6 (d)	6.93
CO	172.9 (s)		6	122.1 (d)	7.00
Val (c)			7	112.2 (d)	7.28
NH		8.68	8	137.8 (s)	
α	57.6 (d)	4.30	9	129.1 (s)	
β	31.8 (d)	1.75	CO	174.4 (s)	
γ	19.8 (g)	0.97	Gly (j)		
δ	19.2 (g)	0.81	NH		8.06
CO	171.1 (s)		α	43.4 (t)	4.10, 3.00
Pro (d)			CO	170.2 (s)	
N			Val (k)		
α	61.0 (d)	4.32	NH		8.17
β	31.2 (t)	2.09, 1.80	α	58.6 (d)	5.05
γ	25.5 (t)	1.90, 1.73	β	33.4 (d)	1.85
δ	49.0 (t)	3.60, 3.60	γ	19.9 (g)	0.80
CO	174.3 (s)		δ	19.0 (g)	0.77
Gly (e)			CO	173.1 (s)	
NH		7.33	Asp (l)		
α	43.6 (t)	4.10, 3.73	NH		8.83
CO	170.7 (s)		α	50.4 (d)	4.84
Cit (f)			β	41.3 (t)	3.11, 2.43
NH		8.57	CO	173.0 (s)	
α	56.1 (d)	4.05	γ -CO	177.5 (s)	
β	28.7 (t)	1.51, 1.51	Acyl (m)		
γ	27.0 (t)	1.20, 0.98	1	171.5 (s)	
δ	40.1 (t)	2.90, 2.84	2	41.2 (t)	2.90, 2.25
CO	176.1 (s)		3	72.9 (d)	5.08
NHCONH ₂	162.3 (s)		4	33.2 (t)	1.58, 1.50
NHCONH ₂		5.90	5	30.9 (t)	
NHCONH ₂		5.45	6	30.7 (t)	
OH Trp (g)			7	30.6 (t)	
NH		8.58	8	30.5 (t)	1.30-1.20 (14H, m)
α	56.6 (d)	4.68	9	30.4 (t)	
β	27.9 (t)	3.47, 3.02	10	28.5 (t)	
NH		10.08	11	27.0 (t)	
2	125.7 (d)	7.13	12	40.2 (t)	1.13
3	110.5 (s)		13	29.1 (d)	1.50
4	103.6 (d)	7.03	14	23.0 (q)	0.83
5	151.5 (s)		15	23.0 (q)	0.83
6	112.8 (d)	6.78			
7	113.0 (d)	7.18			
8	133.2 (s)				
9	129.1 (s)				
CO	174.1 (s)				

生物学的活性

KB425796-A の病原真菌に対する抗真菌活性を Table 1-4 にまとめた。KB425796-A は *A. fumigatus* に強い抗真菌活性を発揮するとともに、*T. asahii*、*R. oryzae*、*P. boydii*、*C. neoformans* といった Micafungin 耐性真菌に対しても強い抗真菌活性を示した。とくに *T. asahii* に対しては強い作用を示した。一方、*C. albicans* には抗真菌活性を示さなかった。KB425796-A を作用させた *A. fumigatus* の菌糸を顕微鏡観察したところ、菌糸の膨張が見られた(Fig. 1-2 e)。これは Micafungin の作用で見られる菌糸の短い分岐とは異なる形態変化であり、既存の真菌細胞壁合成阻害剤の作用と比較した中では Nikkomycin X と類似の形態変化であった。KB425796-A のマウス白血病細胞 EL-4 に対する細胞毒性の IC₅₀ は >50 µg/mL であった。

Table 1-4 KB-425796-A および Micafungin の抗真菌スペクトル

Test organism	MEC (µg/ml)	
	KB425796-A	micafungin
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	6.25	0.05
<i>Candida albicans</i> FP633	>50	0.01
<i>Cryptococcus neoformans</i> YC203	3.13	>50
<i>Trichosporon asahii</i> FP2044	1.56	50
<i>Rhizopus oryzae</i> FP1988	3.13	50
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	6.25	>50

考察

本研究では、青森県十和田湖周辺土壌から採取した細菌 530603 株の培養物より新規のリポペプチド構造を有する抗真菌物質 KB425796-A を単離し、その物理化学的性質の研究および構造決定を行った。また生産菌である 530603 株の菌学的性状を調べるとともに、分類学的研究を行い、*Paenibacillus* 属であると同定した。16S rRNA 遺伝子配列解析から 530603 株は *P. dendritiformis* と近縁であることが示されたものの、その基準株 T168T 株(BGSC 30A1)との間に

はいくつかの菌学的性状において違いが見られた。これらのことから 530603 株が *Paenibacillus* 属の新種である可能性が高いと考えられたが、結論を得るには今後さらに詳細な研究が必要である。

これまでに報告のある微生物二次代謝産物のなかで 12 アミノ酸からなる 40 員環 macrocyclic lipopeptidolactone は WAP-8294⁽³¹⁾と FR901469^(32, 33)のみである。WAP-8294 は methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA)に対する抗菌物質として発見されたが、抗真菌作用は見られていない。FR901469 は β -1,3-glucan 合成酵素阻害剤としてカビ 11243 株培養物から単離された物質である。 β -1,3-glucan 合成酵素阻害活性をもつ抗真菌剤である Micafungin と同じく、FR901469 は *A. fumigatus* 菌糸に対して短く分岐を繰り返す形態変化を誘導することが知られている⁽³⁴⁾。これに対して、KB425796-A は *A. fumigatus* 菌糸に対して膨張した形態変化を誘導することから、KB425796-A は FR901469 と異なる作用機序を有していると推察される。さらに、KB425796-A は Micafungin 耐性真菌である *T. asahii*、*R. oryzae*、*P. boydii*、*C. neoformans* に対して抗真菌活性を発揮した。*Candida* 属および *Aspergillus* 属に対する Micafungin の臨床上的有用性は確立されているが⁽³⁵⁾、上記の Micafungin 耐性病原真菌の存在が臨床上的課題として残っている^(36, 37)。本研究は、これら病原真菌による感染症に対する治療薬として KB425796-A が有用である可能性を示すものである。また KB425796-A の単離精製の過程において、HPLC 分析の結果から 530603 培養物中に多数の類縁体とみられる物質が存在する事が示唆された（第 2 章参照）。第 2 章ではこれら類縁体の単離精製、構造解析を行うとともに、それらの抗真菌活性との構造活性相関について論じ、第 3 章では KB425796-A 類縁体の実験動物を用いた *in vivo* 感染モデルにおける有効性についてさらに検討した。

第二章 新規抗真菌物質 KB425796-B-K の発見

天然由来の生理活性化合物は一般的に化学的に合成する事が難しいことから、その類縁体を自然界から探索し、評価することは、化合物の構造と生理活性の関係を理解するうえで非常に重要なアプローチである。新規物質の類縁体を探索するうえで鍵となるのは、その化合物の特異的な生理活性に基づいた評価系を構築する事ができるかどうかにある。第二章では、KB425796-A の Micafungin との相乗作用にもとづき、530603 株の培養液から新規の KB425796-A 類縁体を複数取得した結果について論じる。

第一章で KB425796-A の *A. fumigatus* 菌糸に対する作用を観察したところ菌糸の膨張が見られた。これを β -1,3-glucan 合成阻害剤である Micafungin、chitin 合成阻害剤である Nikkomycin X、mannoprotein の構成要素の一つである glycosylphosphatidylinositol の阻害剤である Dactylfungin A の作用と比較したところ、Nikkomycin X と類似の形態変化であった。Nikkomycin X の類縁体である Nikkomycin Z は *A. fumigatus* に対して *in vitro* および *in vivo* で Micafungin と併用することで相乗的に作用することが報告されている^(23, 38)。そこで、まず KB-425796-A が *A. fumigatus* に対して Micafungin と相乗的に作用するかについて検討した。一方、第一章で検討した過程において、530603 株の培養液アセトン抽出物の HPLC 分析の結果から多数の類縁体とみられる物質の存在が示唆されていたことから、上記の Micafungin との相乗的な作用に基づいて新規の類縁体が取得できるかについても試み、取得した 10 の類縁体 KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の物理化学的性質および抗真菌活性について評価し比較検討した。

材料及び方法

HPLC 分析方法

培養液アセトン抽出物および精製工程画分に含まれる KB425796-A 類縁体の測定は下記条件の HPLC 分析により行った。カラム：L-column ODS 250 mm × 4.6 mm I.D.(化学物質評価研究機構)、移動相：アセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸(42 : 58 : 0.1)、流速：1 mL/min、検出：210

nm における吸光度。

抗真菌活性の測定方法

精製工程画分および単離精製した KB425796-A 類縁体の抗真菌活性は第一章と同様の方法で測定した。顕微鏡にて試験菌の増殖および形態変化を観察し、菌の増殖を抑制する効果が見られる最小濃度を MEC : minimum effective concentration、菌の増殖を完全に阻害する最小濃度を MIC : minimum inhibition concentration とし、各値を求めた。

KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の単離精製

第一章記載の方法で培養した *Paenibacillus* 530603 株培養液 20 L を KB425796-A を取得した際と同様に DIAION HP-20(三菱化学)カラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー(Daisogel SP-120-ODS-B(15/30 μ m ; DAISO))に供し、それぞれの溶出条件における溶出液を得た(Fig. 2-1)。得られた溶出液について HPLC 分析および抗真菌活性評価を行い、各フラクションに KB425796-A 類縁体が濃縮されていることを確認した。同じ活性成分ピークを含むフラクションごとにまとめ、減圧濃縮・乾固し、各成分の粗精製物を得た。この粗精製物を 2 mL のメタノールに溶解し、カラム : L-column ODS 250 mm \times 20 mm I.D.(化学物質評価研究機構)、移動相 : アセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸(42 : 58 : 0.1)、流速 : 5 mL/min の HPLC に供し、溶出液を分取した。得られたフラクションについて HPLC 分析および抗真菌活性評価を行い、単一の活性成分ピークを含むフラクションごとにまとめ、減圧濃縮・乾固し、白色粉末を得た。得られた粉末を少量のメタノールに溶解し、aminopropyl silica gel (75/150 μ m ; 東京化成工業)カラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム-メタノール(1 : 1)で溶出した。得られたフラクションについて HPLC 分析および TLC 分析(Table 2-1)を行い、単一物質に精製されたことを確認し、減圧濃縮・乾固し KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の白色粉末として取得した。

Fermentation broth (20 L)
| extracted with acetone
Acetone extracts
| added water
HP-20 column chromatography
| eluted with methanol
ODS column chromatography
| eluted with 45% acetonitrile-0.1% TFA
ODS column chromatography
| eluted with 42% acetonitrile-0.1% TFA
ODS column chromatography
| eluted with 40% acetonitrile-0.1% TFA
ODS column chromatography
| eluted with methanol
| concentrated *in vacuo*
Preparative HPLC with L-column
| eluted with 42% acetonitrile-0.1% formica acid
| concentrated *in vacuo*
Aminopropyl silica gel column chromatography
| eluted with chloroform:methanol=1:1
| concentrated *in vacuo*
| dried up
White powder (A 1.5 g, B 1.1g, C 1.8g, D 0.4g, E 0.9g, F 0.8g,
G 19mg, H 31mg, I 36mg, J 60mg, K 280mg)

Fig. 2-1 KB425796-A 類縁体の単離精製プロセス

アミノ酸分析

シトルリン標準品、オルニチン標準品、5-ヒドロキシトリプトファン標準品およびKB425796-Cについて以下の通り処理し、分析用試料とした⁽³⁹⁾。各 2 mg を試験管に入れ、4% チオグリコール酸含有 6 mol/L 塩酸 200 μ L を添加し、窒素置換しながら減圧封管した。これを 110°C のオーブンで 22 時間加熱し、室温まで冷却後、開管した。内容物を精製水 2 mL に溶解し、別の試験管に移して凍結乾燥した。得られた粉末を希釈内部標準液 1000 μ L に溶解し、遠心式濾過ユニットで濾過し、分析用試料を得た。分析用試料および測定用標準アミノ酸溶液をアミノ酸分析計 L-8800A（日立製作所）を用いて測定した。

酵母遺伝子破壊株に対する感受性評価

96 ウェル平板 microtiter plate(住友ベークライト)に G418 100 $\mu\text{g/mL}$ を含む YPD 培地 100 μL を添加した。*Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株ライブラリー5396 株 (Thermo Fisher Scientific Inc) から株ごとに各ウェルに接種し 30°C で 24 時間培養した。そこから 1/1000 量を、新たに G418 を含む YPD 培地を添加したプレートに播種した。薬剤は KB425796-C を 10 $\mu\text{g/mL}$ となるよう添加した。感受性を示した株について KB425796-C の濃度を 50~0.8 $\mu\text{g/mL}$ に希釈し、48 時間、培養温度を 25°C と 30°C の各条件に分けて再評価した。

結果

KB425796-A による *A. fumigatus* 菌糸の形態変化

第一章で示した通り、KB425796-A は Nikkomycin X と類似の形態を示し、菌糸が伸長の途中で球形に膨張する形態が見られた。一方で、Micafungin 単独では菌糸が短く分岐を繰り返した形態が見られた(Fig. 2-2)。次に、Nikkomycin X 6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と Micafungin 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時に培地に添加したもの、および KB425796-A 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と Micafungin 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を同時に培地に添加したものを培養した際の菌糸の形態変化を観察した結果、いずれにおいても胞子がそのまま完全な球形に膨張したような形態が見られた(Fig. 2-2)。Micafungin との併用におけるこの特徴的な形態変化は、KB425796-A の精製過程の各フラクションにおいても生物活性として検出することができたことから、精製フラクションに含まれる KB425796-A と同じ作用を持つ物質とその他様々な化学物質による *A. fumigatus* 生育阻害とを区別する事ができると考えられた。

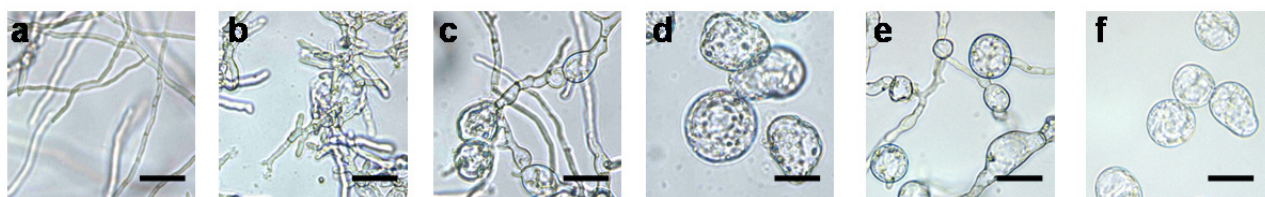


Fig. 2-2 KB425796-A および Nikkomycin X の *A. fumigatus* に対する Micafungin 併用効果

a) Control b) Micafngin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ c) KB425796-A 3.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d) Micafungin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + KB425796-A 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e) Nikkomycin X 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ f) Micafungin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + Nikkomycin X 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Size bar, 100 μm

KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の単離と物理化学的性質

上述の知見をもとに、KB425796-A 生産菌である *Paenibacillus* 530603 株培養液に含まれる複数の化学物質をカラムクロマトグラフィーにより分離し、それぞれの Micafungin 併用における抗真菌活性を評価することで、KB425796-A 類縁体 KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K(Fig. 2-3)を得た。

KB425796-B ~ -K の物理化学的性質を Table 2-1 にまとめた。すべての類縁体はメタノール、ジメチルスルホキシドに易溶、クロロホルム、アセトンに僅かに可溶、水、酢酸エチルには不

溶で、硫酸セリウム、ヨウ素、ニンヒドリンの各反応によって呈色し、Molish、Dragendorff、塩化鉄(III)には呈色しなかった。UV 吸収の極大はいずれの化合物も 280nm および 290 nm であった。IR スペクトルに見られる 1650 cm^{-1} および 1540 cm^{-1} の吸収はペプチド結合の存在を指示した。HR-ESI-MS 分析において、すべての化合物は 2 価の水素イオン付加ピーク $[M+2H]^{2+}$ がメインピークとして見られ、1 価の水素イオン付加ピークがマイナーピーク $[M+H]^+$ として検出された。

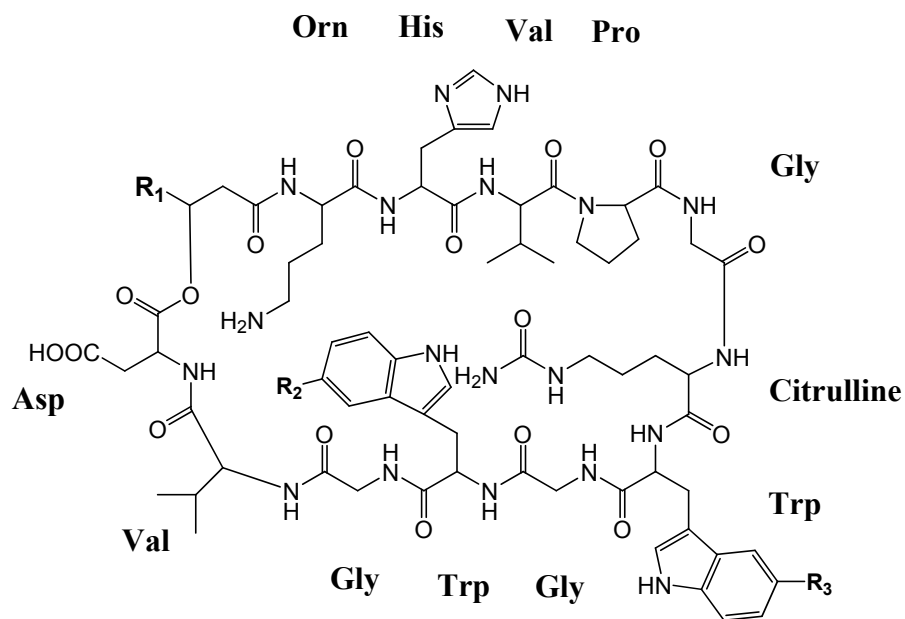
KB425796-C の HR-ESI-MS ピークは 1646.9061 Da ($[M+H]^+$) に検出され、KB425796-A の分子式 $C_{79}H_{115}N_{19}O_{18}$ よりも C_2H_4 大きい分子式 $C_{81}H_{119}N_{19}O_{18}$ (理論値: $[M+H]^+$ 1646.9059 Da) に一致した。KB425796-C の ^1H NMR スペクトルを KB425796-A のものと比較すると、(δ_H 1.30-1.20) の積分値の違いを除いては非常に類似していた。加えて、KB425796-C と KB425796-A の ^{13}C NMR データを比較したところ、KB425796-C では 2 つの methylene シグナルが多く見られた(δ_C 30.7(t), δ_C 30.6(t))。COSY, HSQC, HMBC 解析から 2-methylpropyl 基および 3-hydroxybutyryl 基の存在が示された。以上のデータより KB425796-A の 3-hydroxy-13-methylmyristoyl 基が KB425796-C では 3-hydroxy-15-methylmyristoyl 基に置換された構造であると推定された(Fig. 2-3)。この推定構造をもとに、KB425796-C の詳細なアミノ酸分析を実施した。

通常のアミノ酸加水分解条件(6M HCl, 110°C , 18 時間)では試料中の tryptophan(Trp)および 5-hydroxytryptophan(HOTrp)は分解されてしまう。このような酸に弱いアミノ酸を検出するため、4% thioglycolic acid 含有 6 M HCl を用いて 110°C で加水分解する改良法を用いた。KB425796-C の酸加水分解により、1 mol の KB425796-C につき、1 mol の Asp, HOTrp, Trp, His, Pro と 2 mol の Val と 3 mol の Gly が得られた。加えて、1.7 mol の Orn と 0.3 mol の citrulline (Cit) が検出された。同じ加水分解条件において 1 mol の Cit 標品を加水分解したところ、0.7 mol の Orn が生じることが確認されたことから、KB-425796-C には Orn と Cit が 1 mol ずつ含まれることがわかった。以上のアミノ酸分析の結果は、KB425796-C の推定構造と完全に一致した。

残る KB425796-B, -D, -E, -F, -G, -I, -J, -K の構造は HR-ESI-MS スペクトルおよび ^1H NMR, ^{13}C NMR スペクトルを KB425796-C のものと比較することで推定した。KB425796-H については HR-ESI-MS スペクトルから推定した。なお光学異性も含めた KB425796-A 類縁体の完全な構造

決定にはさらなる解析が必要である。

KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -I, -J, -K の ^1H NMR チャートを Fig. 2-4 ~ 2-12 に、 ^{13}C NMR チャートを Fig. 2-13 ~ 2-21 に示した。



	R1	R2	R3
A		H	OH
B		H	OH
C		H	OH
D		OH	OH
E		OH	OH
F		H	OH
G		H	OH
H		H	OH
I		H	OH
J		H	OH
K		H	H

Fig. 2-3 KB425796-A およびその類縁体(KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K)の構造

Table 2-1 KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の物理化学的性質

	B	C	D	E	F
Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder	White powder
$[\alpha]_D^{25}$	-22.1	-26.8	-11.0	-13.4	-21.7
HRESI-MS (m/z)					
Found	1632.8905	1646.9061	1634.8694	1662.9000	1646.9054
Calcd for M+H	1632.8902	1646.9059	1634.8695	1662.9008	1646.9059
Molecular formula	C ₈₀ H ₁₁₇ N ₁₉ O ₁₈	C ₈₁ H ₁₁₉ N ₁₉ O ₁₈	C ₇₉ H ₁₁₅ N ₁₉ O ₁₉	C ₈₁ H ₁₁₉ N ₁₉ O ₁₉	C ₈₁ H ₁₁₉ N ₁₉ O ₁₈
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ)	290(11700), 280(14200)	290(7400), 280(9100)	290(6200), 280(8000)	290(8300), 280(11100)	290(8200), 280(10000)
Color test					
Positive	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin
Negative	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃
Solubility					
Soluble	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO
Insoluble	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc
IR λ_{max} (KBr) cm ⁻¹	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	3300, 2930, 2850, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	3300, 2930, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	3300, 2930, 2850, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230
TLC (Rf value)*	0.40	0.50	0.31	0.31	0.50
Amino acid analysis		Gly(3), Val(2), Asp(1), His(1), Orn(1), Pro(1), Trp(1), HOTrp(1), Citruline(1)			

	G	H	I	J	K
Appearance	White powder	White powder	White powder	White powder	White powder
$[\alpha]_D^{25}$	-21.8	NT	-13.5	-15.9	-31.9
HRESI-MS (m/z)					
Found	1632.8910	1618.8777	1604.8590	1604.8588	1602.8794
Calcd for M+H	1632.8902	1618.8778	1604.8589	1604.8589	1602.8796
Molecular formula	C ₈₀ H ₁₁₇ N ₁₉ O ₁₈	C ₇₈ H ₁₁₃ N ₁₉ O ₁₈	C ₇₈ H ₁₁₃ N ₁₉ O ₁₈	C ₇₈ H ₁₁₃ N ₁₉ O ₁₈	C ₇₉ H ₁₁₅ N ₁₉ O ₁₇
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ)	280(11600),	NT	290(8300), 280(10300)	290(8700), 280(10600)	290(12800), 280(14700)
Color test					
Positive	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin	I ₂ , Ce(SO ₄) ₂ -H ₂ SO ₄ , Ninhydrin
Negative	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃	Molish, Dragendorff, FeCl ₃
Solubility					
Soluble	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO	methanol, DMSO
Insoluble	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	H ₂ O, EtOAc	
IR λ_{max} (KBr) cm ⁻¹	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	NT	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230	3300, 2930, 2860, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1200	3300, 2930, 2360, 1650, 1540, 1460, 1400, 1230
TLC (Rf value)*	0.40	0.40	0.30	0.30	0.52

*Silica gel 60 NH₂ F254s (MERCK):methanol-chloroform (1:1); NT, not tested

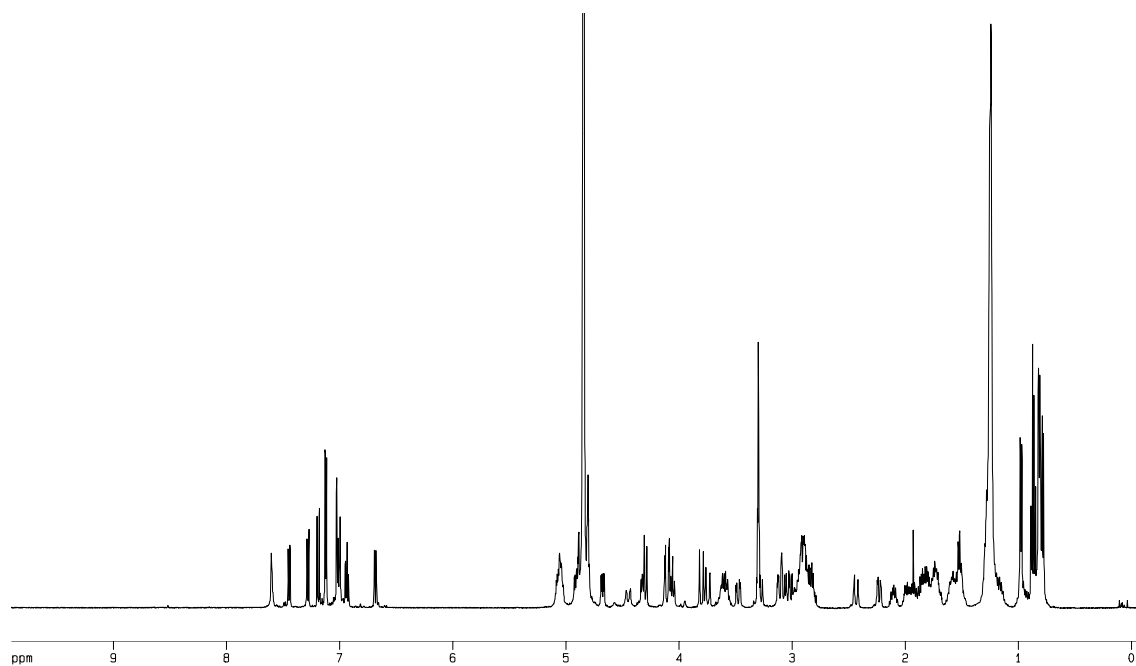


Fig. 2-4 KB-425796-B の ^1H NMR チャート

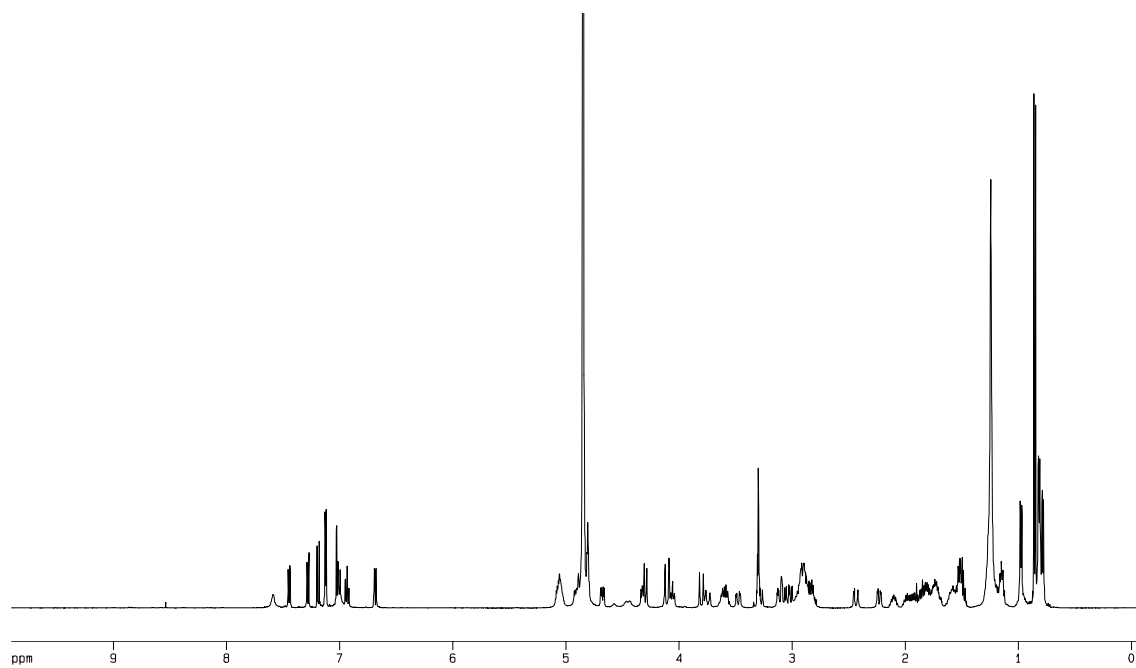


Fig. 2-5 KB-425796-C の ^1H NMR チャート

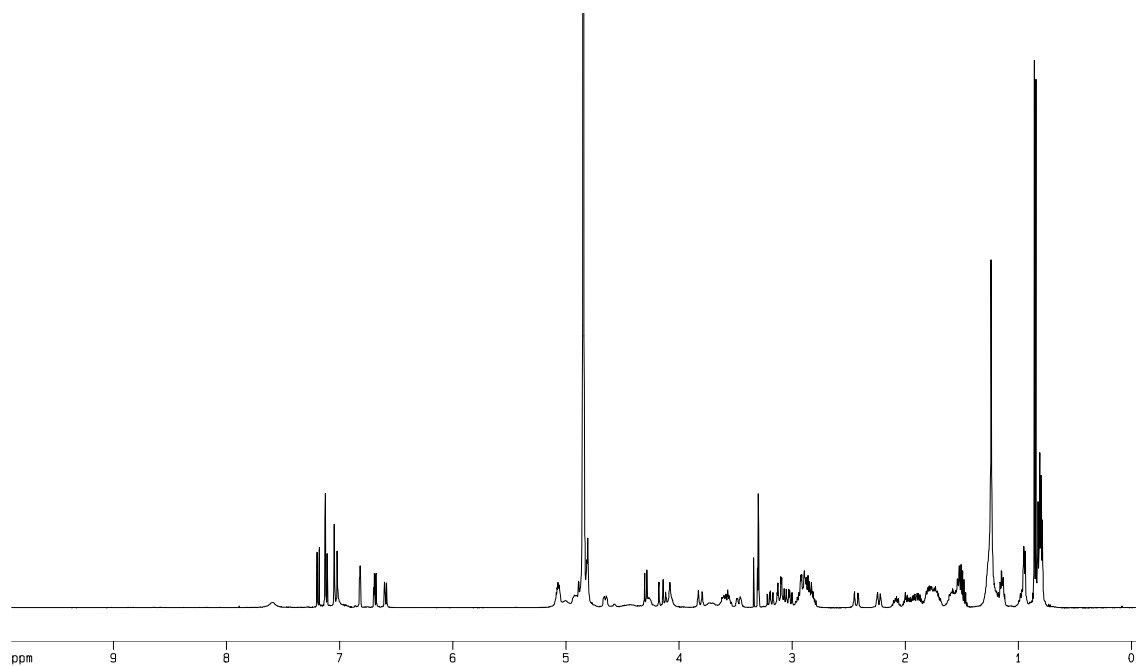


Fig. 2-6 KB-425796-D の ^1H NMR チャート

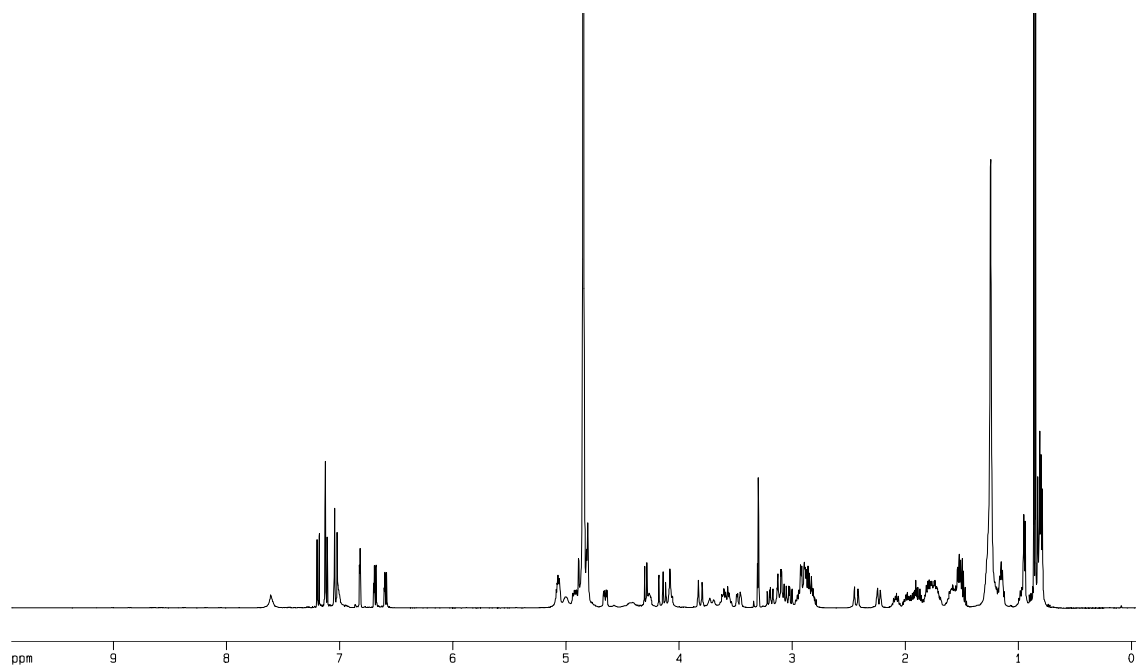


Fig. 2-7 KB-425796-E の ^1H NMR チャート

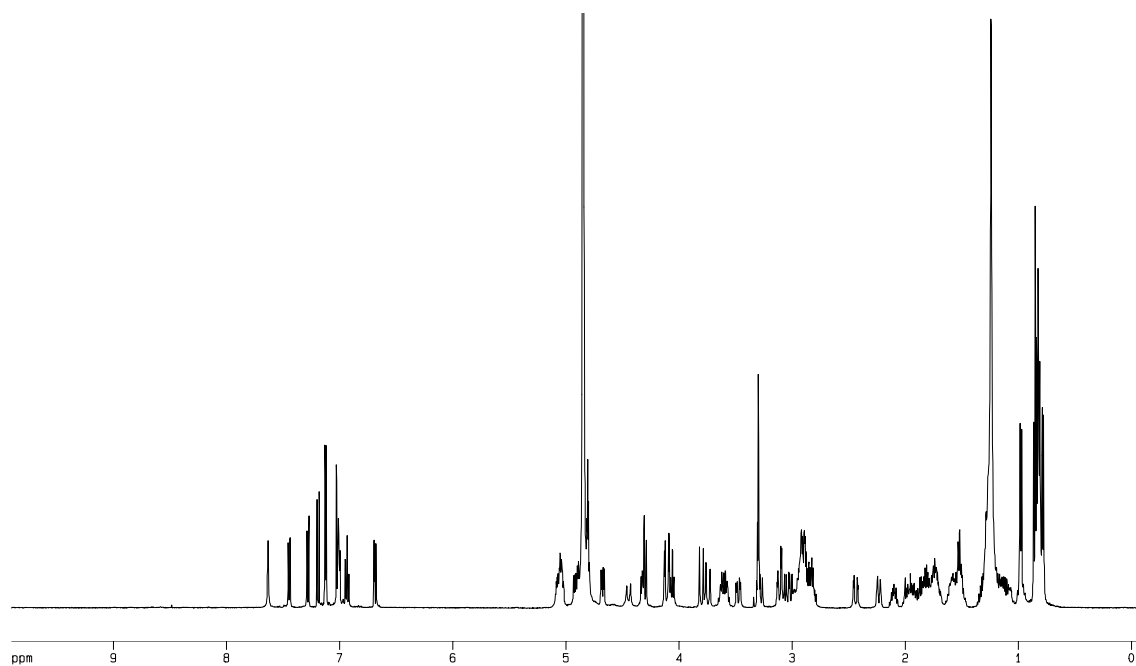


Fig. 2-8 KB-425796-F の ^1H NMR チャート

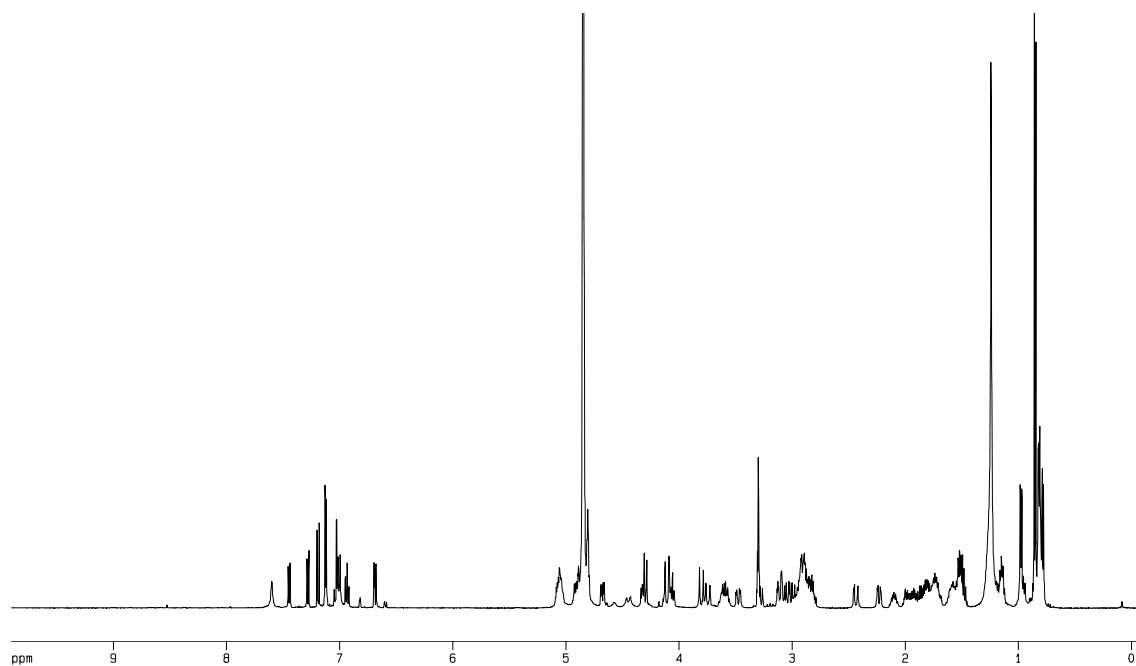


Fig. 2-9 KB-425796-G の ^1H NMR チャート

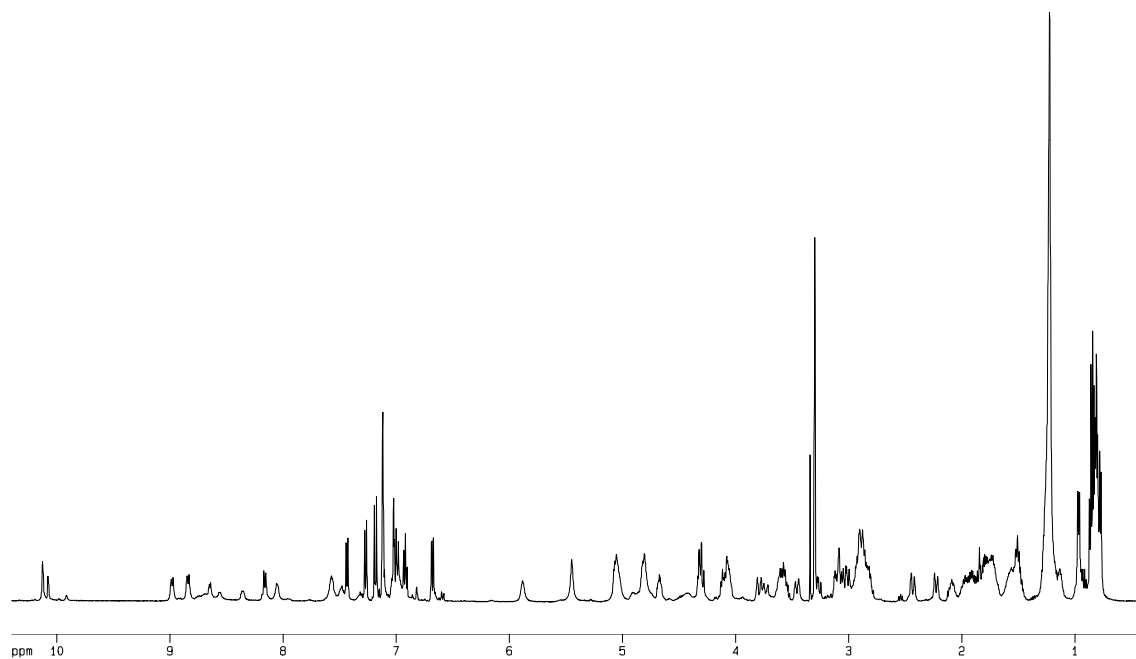


Fig. 2-10 KB-425796-I の ^1H NMR チャート

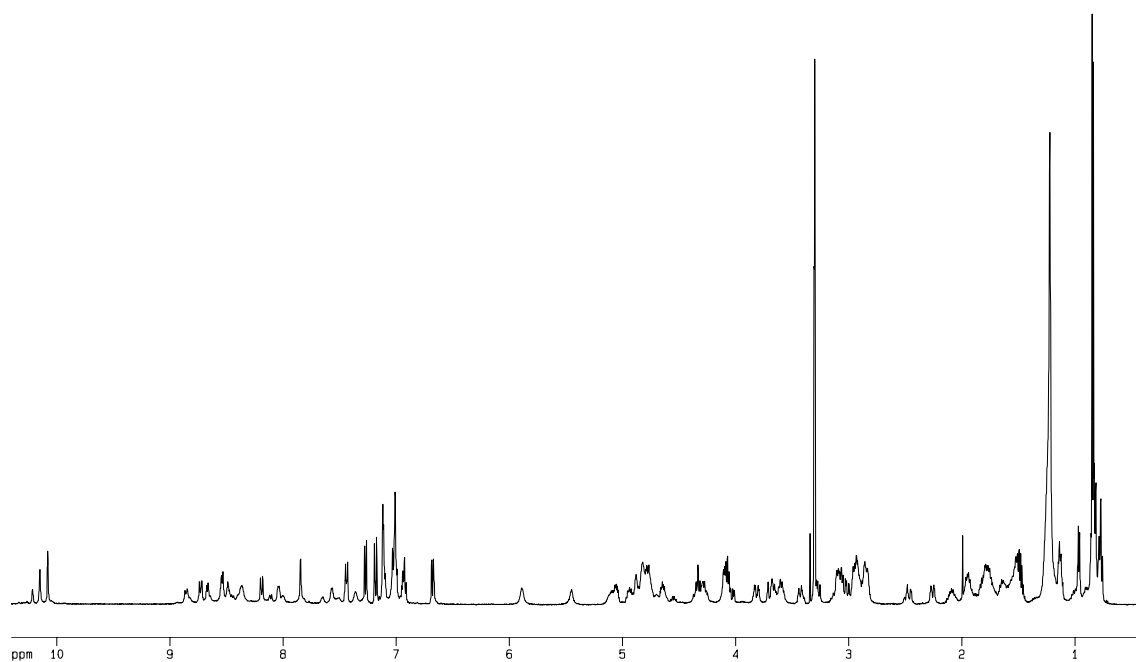


Fig. 2-11 KB-425796-J の ^1H NMR チャート

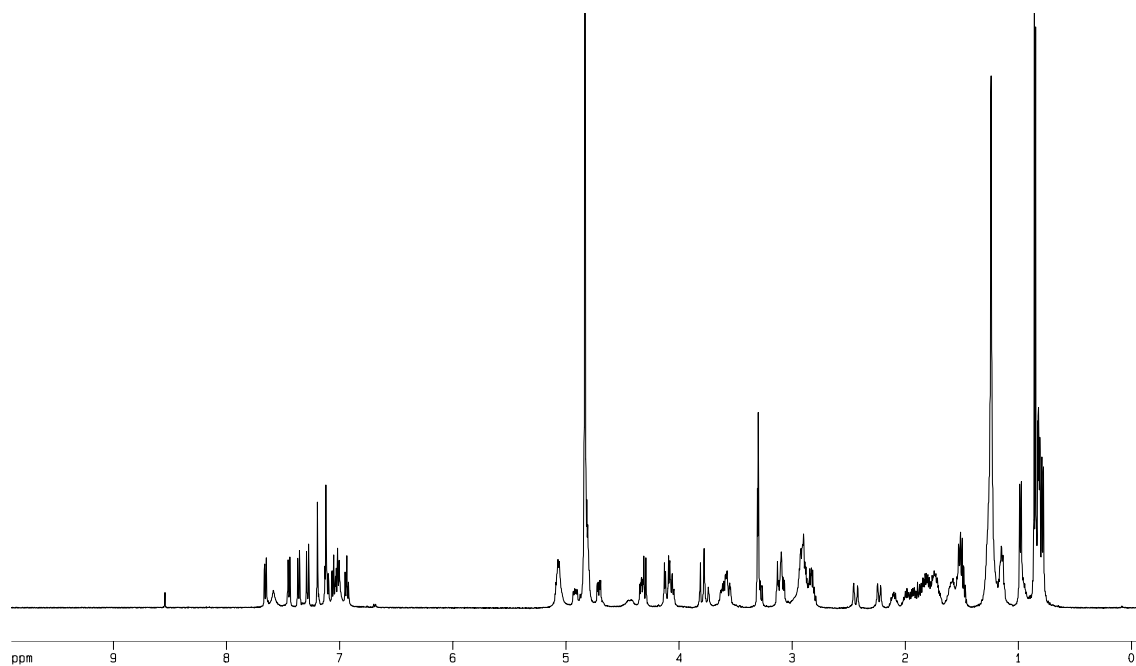


Fig. 2-12 KB-425796-K の ^1H NMR チャート

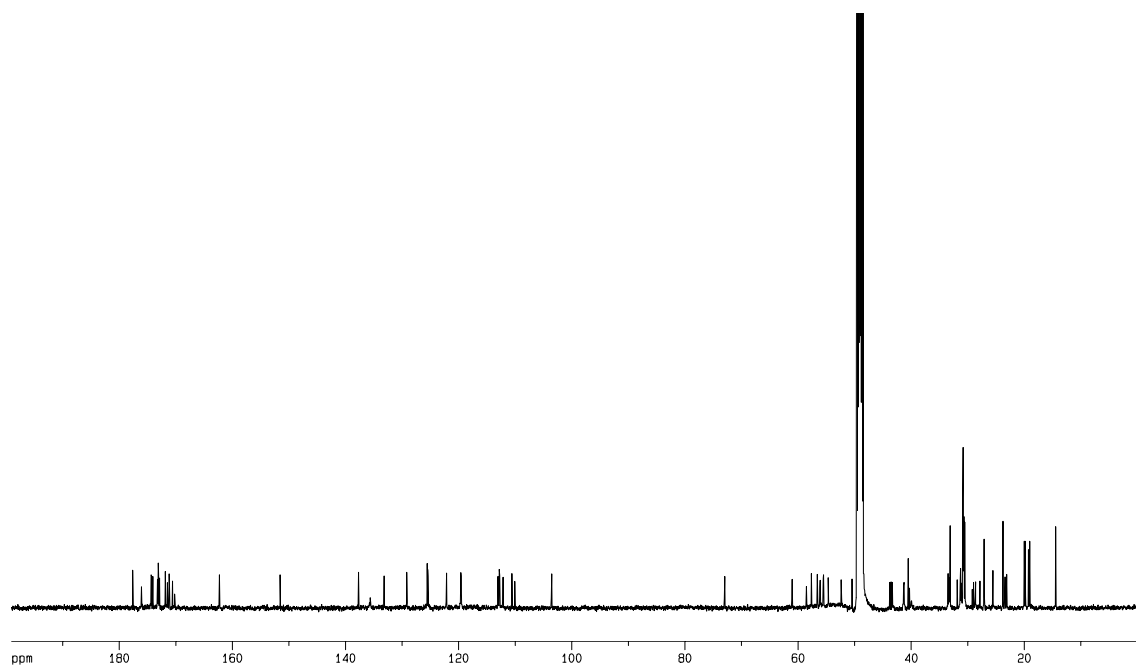


Fig. 2-13 KB-425796-B の ^{13}C NMR チャート

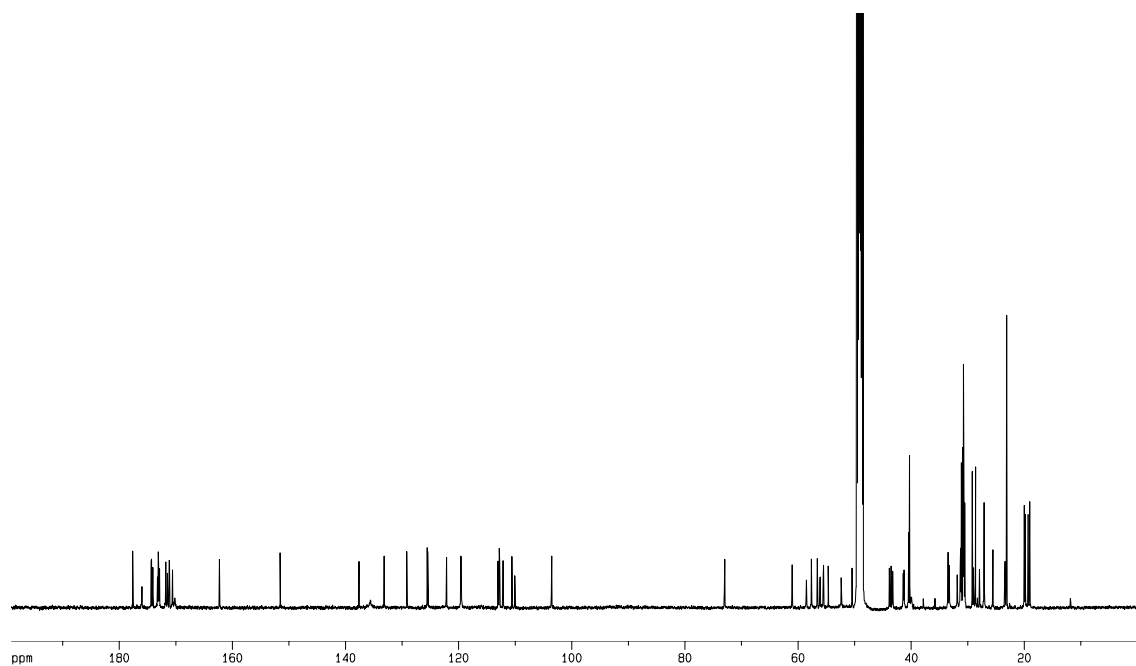


Fig. 2-14 KB-425796-C の ^{13}C NMR チャート

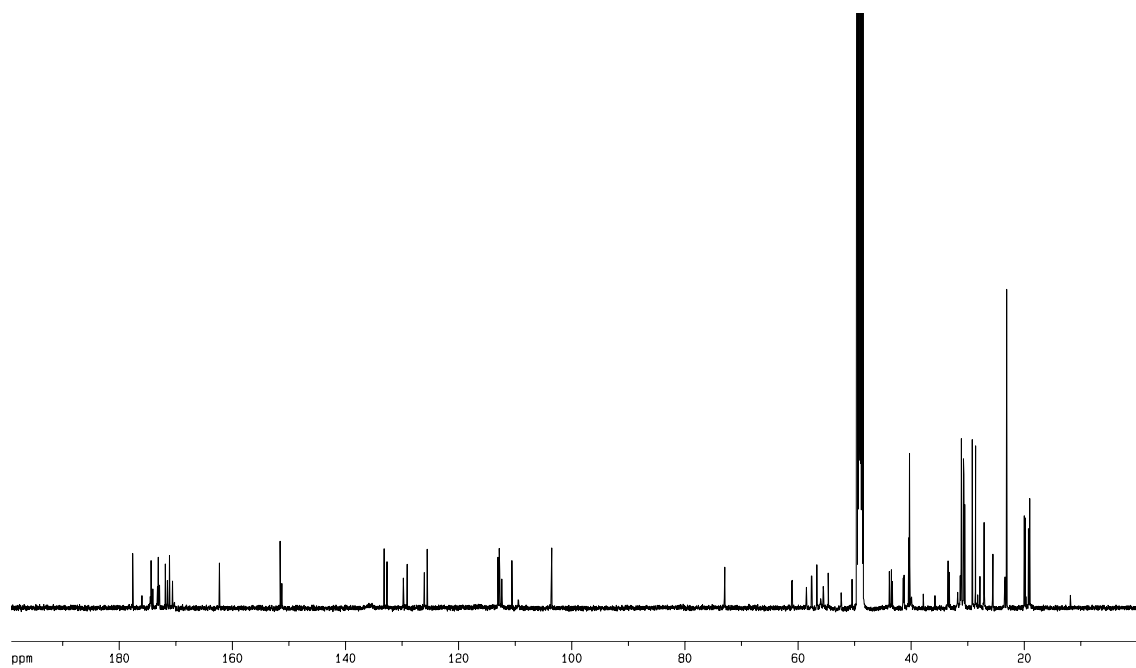


Fig. 2-15 KB-425796-D の ^{13}C NMR チャート

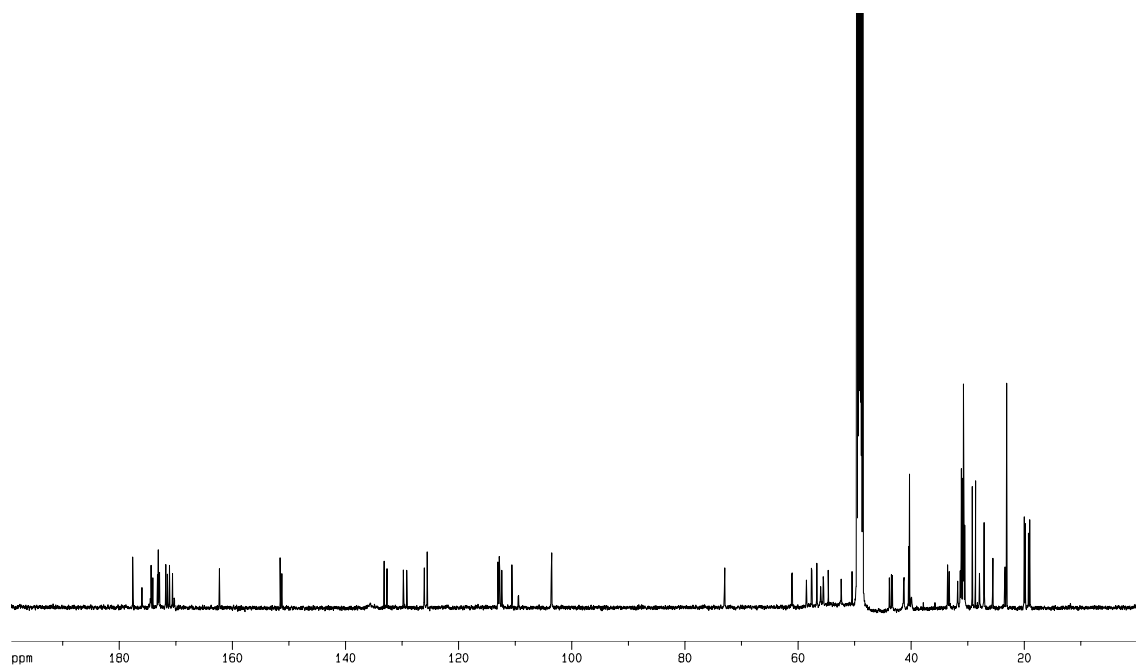


Fig. 2-16 KB-425796-E の ^{13}C NMR チャート

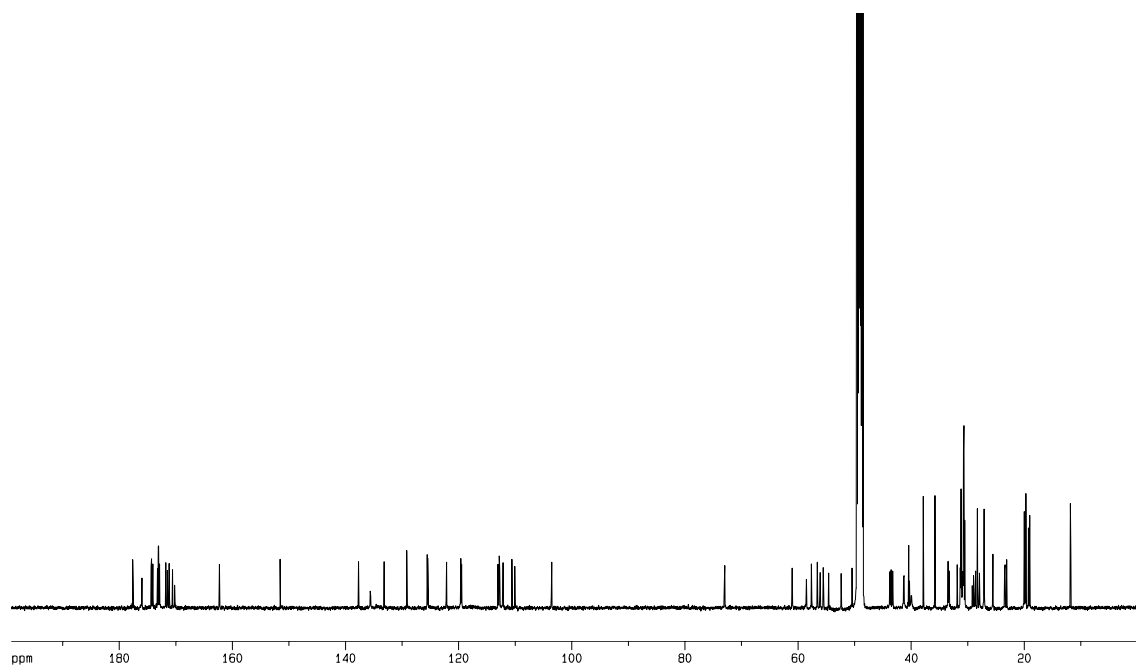


Fig. 2-17 KB-425796-F の ^{13}C NMR チャート

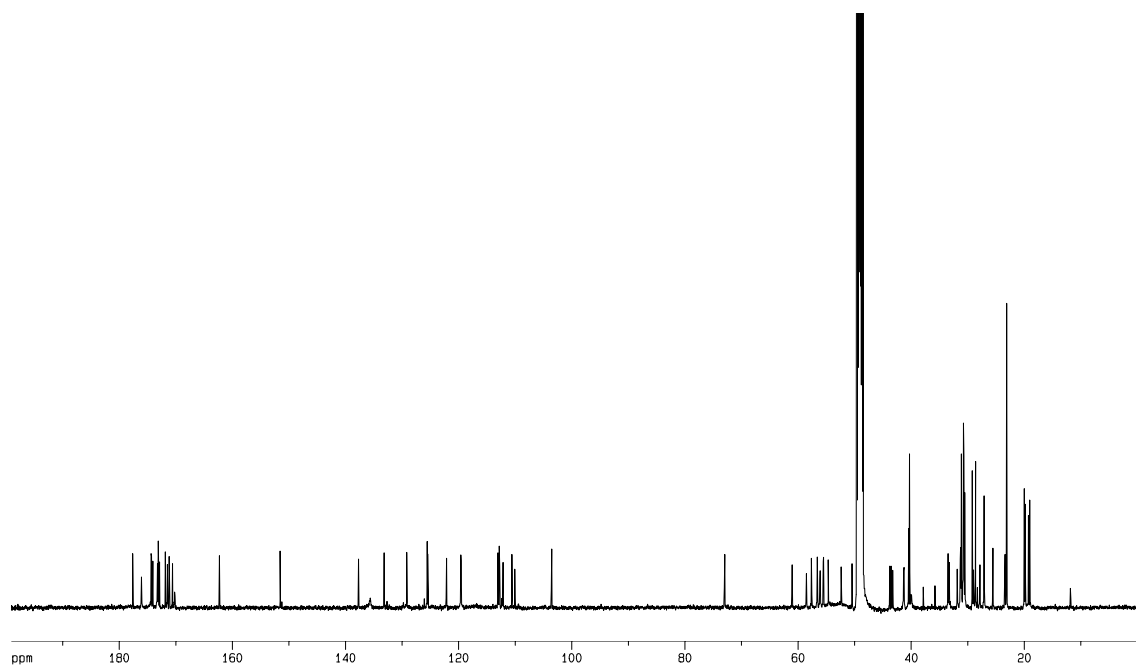


Fig. 2-18 KB-425796-G の ^{13}C NMR チャート

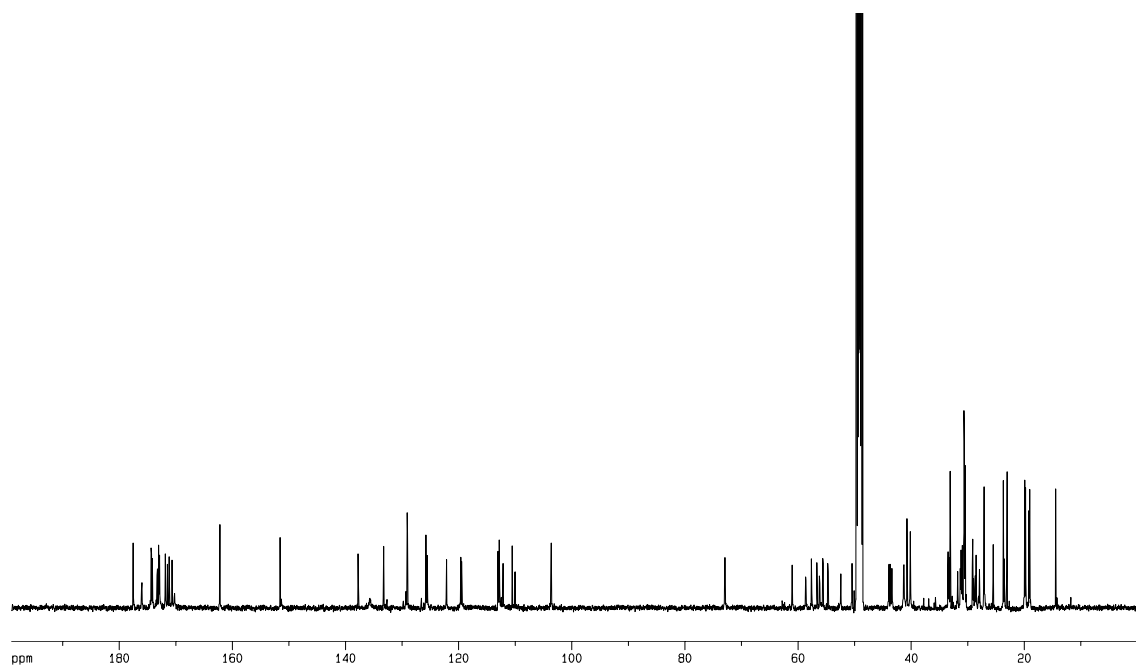


Fig. 2-19 KB-425796-I の ^{13}C NMR チャート

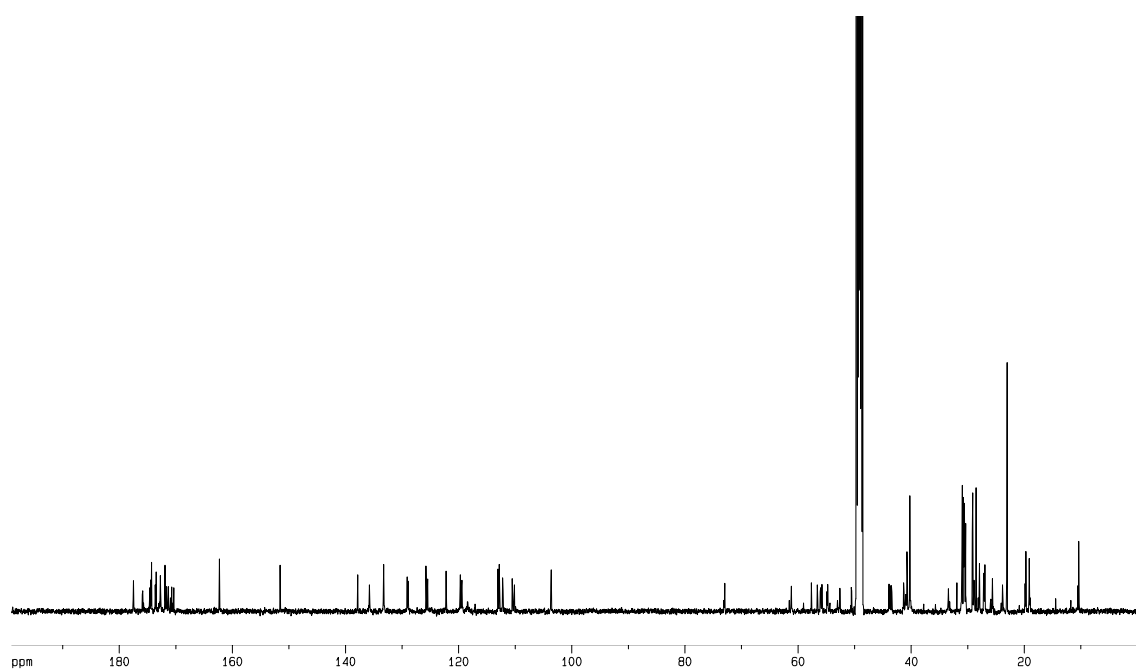


Fig. 2-20 KB-425796-J の ¹³C NMR チャート

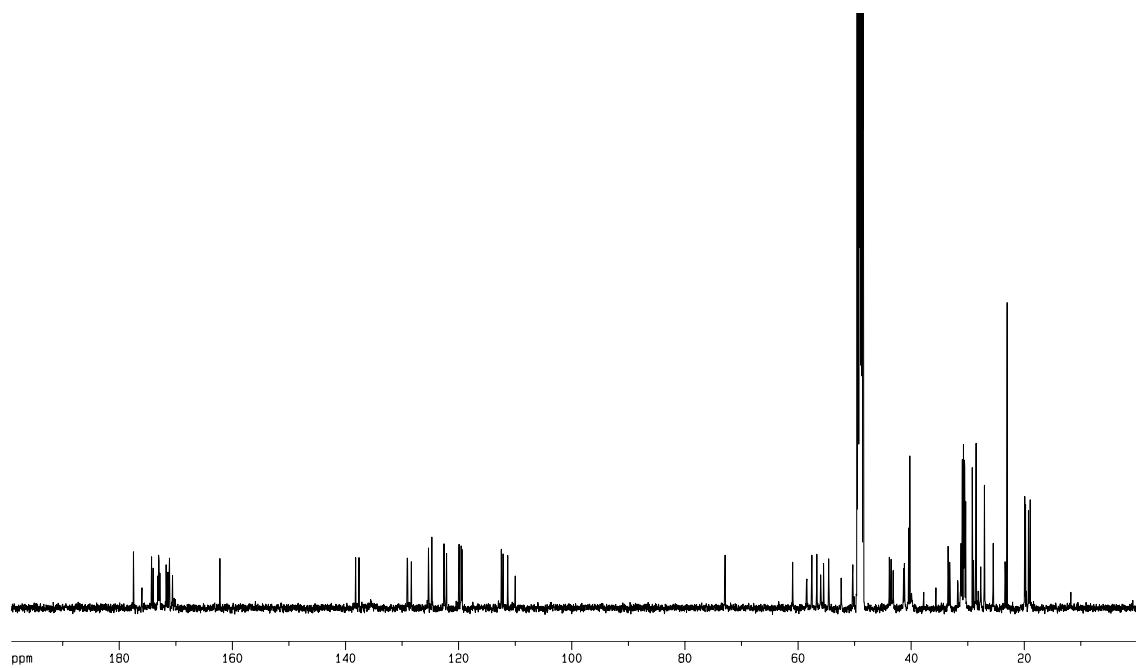


Fig. 2-21 KB-425796-K の ¹³C NMR チャート

KB425796-B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K の抗真菌活性

KB425796-A ~ -K の抗真菌活性を Table 2-2 にまとめた。いずれの化合物も *C. albicans* には抗真菌活性を示さなかった。一方 *A. fumigatus* に対しては、いずれも菌糸が膨張する形態変化を伴う抗真菌活性を示した。加えて、いずれの化合物も Micafungin と併用することで相乗作用を示し、孢子からそのまま球形に膨張する形態変化が見られた。KB425796-A ~ -K は単剤で使用する *A. fumigatus* に対する MEC は 2.5 ~ 10 µg/mL であり、静菌的な作用であるため MIC は >50 µg/mL であった。それに対し、0.05 µg/mL の Micafungin と併用した際の抗真菌活性は非常に増強されることが示された。また、KB425796-A 類縁体および Micafungin はいずれも *A. fumigatus* に対して静菌的な作用であるにもかかわらず、併用することで殺菌的な作用が得られる事も示された。Micafungin 併用の条件における KB425796-A 類縁体の MIC は 0.16 ~ 2.5 µg/mL であり、KB425796-B, -C, -E, -F, -G で最も強かった(0.16 µg/mL)。これら類縁体のうち、KB425796-B, -C, -E, -F は単剤で使用情况の場合の MEC も、2.5 µg/mL と取得した類縁体の中で最も強かった。興味深いことに、最も強い MEC を示した化合物は、いずれも C13-C14 の脂肪酸側鎖構造をもつ化合物であり、最も弱い化合物は C12 の脂肪酸構造を持つ化合物であった。

取得した類縁体のうち、KB425796-C が最も生産量が多く、かつ *A. fumigatus* に対する抗真菌活性の強い化合物であったことから、KB425796-C について種々の病原真菌に対する抗真菌活性を、既知の化合物も交えて比較検討した(Table 2-3)。

KB425796-C は様々な病原真菌に対して強い抗真菌活性を示し、とくに *T. asahii* に対して強い作用を示した。*T. asahii* は azole 系抗真菌剤や candin 系抗真菌剤に対して抵抗性の病原真菌の一つである。KB425796-C の菌糸の形態への作用を顕微鏡下で観察したところ、糸状菌である *A. fumigatus* および *R. oryzae* に対して、菌糸の膨張が誘導されていた。類似の形態変化は Nikkomycin X による処理でも見られたが、Micafungin 処理によって見られる変化とは異なっていた。

Table 2-2 KB425796-A ~ -K の抗真菌活性

Test organism	MEC (µg/ml)					
	A	B	C	D	E	F
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	5	2.5	2.5	10	2.5	2.5
<i>Candida albicans</i> FP633	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Test organism	MIC (µg/ml)					
	A	B	C	D	E	F
<i>A. fumigatus</i> FP1305 + micafungin	0.31	0.16	0.16	2.5	0.16	0.16

Test organism	MEC (µg/ml)				
	G	H	I	J	K
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	5	10	5	5	5
<i>Candida albicans</i> FP633	>50	>50	>50	>50	>50
Test organism	MIC (µg/ml)				
	G	H	I	J	K
<i>A. fumigatus</i> FP1305 + micafungin	0.16	2.5	1.3	1.3	1.3

Table 2-3 KB425796-C の抗真菌スペクトル

Test organism	MEC (µg/ml)			
	KB425796-C	micafungin	nikkomycinX	amphotericin B
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	3.13	0.05	6.25	1.25
<i>Candida albicans</i> FP633	>50	0.03	50	1.25
<i>Cryptococcus neoformans</i> YC203	3.13	>50	>50	0.63
<i>Trichosporon asahii</i> FP2044	1.56	50	>50	1.25
<i>Rhizopus oryzae</i> FP1988	1.56	50	6.25	0.31
<i>Fusarium solani</i> FP1930	3.13	>50	>50	0.16
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	1.56	>50	N.T.	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FP2103	25	0.2	N.T.	N.T.

Test organism	MIC (µg/ml)			
	KB425796-C	micafungin	nikkomycinX	amphotericin B
<i>Aspergillus fumigatus</i> FP1305	>50	>50	>50	2.5
<i>Candida albicans</i> FP633	>50	0.78	>50	2.5
<i>Cryptococcus neoformans</i> YC203	>50	>50	>50	1.25
<i>Trichosporon asahii</i> FP2044	3.13	>50	>50	1.25
<i>Rhizopus oryzae</i> FP1988	>50	>50	12.5	1.25
<i>Fusarium solani</i> FP1930	>50	>50	>50	1.25
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	>50	>50	>50	N.T.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FP2103	>50	>50	>50	N.T.

KB-425796-C の酵母遺伝子破壊株に対する作用

S. cerevisiae の遺伝子破壊株ライブラリー5396 株に対して、KB425796-C の抗真菌作用を評価した結果、野生型およびその他の遺伝子破壊株は 10 $\mu\text{g/mL}$ の KB425796-C に対し感受性を示さないのに対し、MNN8、MNN9、MNN10、OCH1、CAX4、YNL140C の 6 種の遺伝子破壊株は Table 2-4 に示す濃度で生育阻害を示した。各遺伝子の機能は Table 2-5 に示した。これら遺伝子は、機能未知の YNL140C を除き、細胞壁合成における機能としては mannoprotein 生合成に関与する機能を有する遺伝子であった。対照として評価した HIS3 (ヒスチジン栄養性機能遺伝子) 遺伝子破壊株は 50 $\mu\text{g/mL}$ でもほとんど薬剤が作用しなかった。*S. cerevisiae* における β -1,3-glucan 合成酵素のひとつである FKS1 破壊株は 30°C では部分的な増殖抑制が見られたが、25°C ではほとんど作用しなかった。chitin 合成酵素のひとつである CHS2 破壊株ではほとんど作用しなかった。

Table 2-4 酵母遺伝子破壊株における KB425796-C 感受性

遺伝子名	MIC(μ g/ml)		MEC(μ g/ml)	
	25°C	30°C	25°C	30°C
MNN8	3.1	6.3	3.1	1.6
MNN9	3.1	6.3	3.1	1.6
MNN10	3.1	6.3	3.1	1.6
OCH1	3.1	3.1	3.1	1.6
CAX4	6.3	>50	3.1	3.1
YNL140C	>50	>50	6.3	1.6
HIS3	>50	>50	>50	>50
FKS1	>50	>50	>50	6.3
CHS2	>50	>50	>50	>50

各遺伝子を破壊した株における培養温度ごとの MIC 値および MEC 値を示した。

Table 2-5 KB425796-C 高感受性を示した株で破壊されている遺伝子

破壊した遺伝子		機能
gene	ID	
MNN8	YEL036C	α -1,6マンノース転移酵素複合体のサブユニットのひとつ。ゴルジ体にglycosyltransferaseを局在化させる機能を有する。浸透圧感受性およびaminonitrophenyl propanediol耐性に関与する。
MNN9	YPL050C	MNN8, Mnn10, Mnn11, Hoc1からなるゴルジ体上のマンノース転移酵素複合体のサブユニットのひとつ。糖鎖のマンナンの伸長を行う。
MNN10	YDR245W	MNN9, Mnn10, Mnn11, Hoc1からなるゴルジ体上のマンノース転移酵素複合体のサブユニットのひとつ。糖鎖のマンナンの伸長を行う。
OCH1	YGL038C	cis-ゴルジ体のマンノース転移酵素で、糖タンパクのN結合型糖鎖のマンノース鎖の伸長反応の開始を担う。
CAX4	YGR036C	ドリコリリン酸を加水分解するドリコリルホスファターゼで、糖タンパクのN結合型糖鎖の付加に必要なドリコリリン酸が付加されたオリゴ糖中間体の生合成に必要。小胞体の内腔側に存在する。
	YNL140C	機能未知

考察

本研究において、*A. fumigatus* は Micafungin と Nikkomycin X で同時に処理することによって、スフェロプラストの様に球形に膨張した形態に変形する事を見出した(Fig. 2-2)。この発見は、Micafungin と Nikkomycin Z が *in vitro* および *in vivo* において *A. fumigatus* に対して相乗的に作用するという論文報告の結果に合致するものであった。

KB425796-A によって誘導される形態変化は、Nikkomycin X のものと類似していたことから、KB425796-A と Micafungin の *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を、単剤および併用の条件下で比較検討することを試みた。その結果、単剤では Micafungin は短く分岐した菌糸の形態を示し、KB425796-A は菌糸が途中で球形に膨張した形態を示したが、両薬剤を併用することで、胞子がそのまま完全な球形に膨張したような形態が見られた。また菌糸の形態変化を誘導する KB425796-A の最小濃度 (MEC) は、Micafungin 併用時のほうが単剤の場合よりも低濃度であった。これらのことから、KB425796-A と類似の作用を有する類縁体を探索するにあたって、Micafungin との併用で抗真菌活性を評価し、KB425796-A で見られた特徴的な形態変化を観察することにより、より高感度かつ特異的に類縁体を同定する事が可能であると考えられた。

本章では KB425796-A を生産する 530603 株の培養液から、溶媒抽出法、HPLC 分取法および aminopropyl silica gel カラムクロマトグラフィー法により、10 種の新規 KB425796-A 類縁体を単離した。また上記の Micafungin 併用の抗真菌活性評価法を用いて第一章と同様にスクリーニングすることにより、530603 株とは別の、KB425796-A 類縁体生産菌を発見することにも成功した(data not shown)。これらのことから、Micafungin 併用の抗真菌活性評価スクリーニングは KB425797-A 類縁体のような新規抗真菌物質や新規 Nikkomycin 類縁体を探索するための強力な研究手法になり得ると考えられる。

KB425796-A 類縁体の構造解析において、2D NMR 解析によりこれら類縁体は KB425796-A と同じ母核構造を有している事がわかった。各種の物理化学的性質が類似していることも、この構造類似性を支持する結果であった。*C. albicans* に対してはいずれの化合物も抗真菌活性を示さない一方で、*A. fumigatus* に対して菌糸の膨張を誘導する活性および Micafungin との併用時

に得られる相乗的な活性を有している点で共通の特徴が見られた。これら特徴から、本章で取得した類縁体が構造のみならず作用機序の点でも共通性を有している事が示唆された。これまでに報告のある微生物二次代謝産物のなかで 12 アミノ酸からなる 40 員環 macrocyclic lipopeptidolactone 構造を有する化合物には WAP-8294⁽³¹⁾と FR901469^(32, 33)があるが、これらは Micafungin とは相乗的に作用しない。これら化合物と KB425796-A 類縁体の大きな構造上の違いは、環状ペプチド母核のアミノ酸配列であり、KB425796-A 類縁体の抗真菌作用における本アミノ酸配列の重要性が示唆される。一方で、*A. fumigatus* に対する抗真菌作用の potency においては、類縁体ごとに違いが見られた。KB425796-B, -C, -E, -F は KB425796-A よりも強い potency を示したことから、脂肪酸側鎖の長い類縁体ほど強い抗真菌作用を持つと推測された。Micafungin の場合も側鎖変換によって活性が変化することが知られている。これは標的である FKS1 複合体が膜タンパク質であるために、側鎖の構造が活性に影響している可能性が考えられるが、KB425796-C においても mannoprotein の生合成の過程で、細胞膜やゴルジ体膜との相互作用が影響している可能性が考えられた。また、Micafungin 併用による抗真菌活性の増強効果が-I, -J, -K は他と比べると小さいが、この理由として、-I, -J では脂肪酸側鎖の炭素数が-A よりさらに少ないために、十分に標的を阻害できていない可能性、-K は分子内に HOTrp が無いことによる水溶性の変化により-A との作用に差が出ている可能性が考えられた。

KB425796-C の抗真菌スペクトルを評価した結果、本化合物は様々な病原真菌に対して抗真菌作用を有し、とくに *T. asahii* に対して強い作用を有する事が示された。*Trichosporon* 属の病原真菌は一般的に *C. albicans* や *A. fumigatus* に比べて Amphotericin B、Micafungin、Fluconazole^(40, 41)といった市販されている抗真菌剤に対する感受性が低く、*Trichosporon* 属感染症に対する治療法は確立されていない。本研究において、KB425796-C が *Trichosporon* 属感染症に対する治療手段となり得る可能性が示された。

KB425796-A と同様に KB425796-C においても、糸状菌である *A. fumigatus* や *R. oryzae* の菌糸を膨張させる作用が見られ、その形態変化は Micafungin の作用とは異なるが、Nikkomycin X の作用と類似したものであった。また、酵母遺伝子破壊株ライブラリーに対する抗真菌活性評価において、KB425796-C は mannoprotein 生合成関連遺伝子の欠損株に対して強い抗真菌作用

を示す一方、chitin や β -1,3-glucan の生合成酵素を欠損した株では感受性変化は見られない、もしくは僅かであった。また、mannoprotein の構成要素の一つである glycosylphosphatidylinositol の阻害剤である Dactylfungin A と KB425796-C を比較した場合に、単剤では形態変化は異なるものの (Fig. 1-2)、Micafungin と併用した場合には、類似の形態変化が見られており (data not shown)、mannoprotein 生合成経路における作用点の違いによって KB425796-C の様な形態変化を誘導する可能性が考えられる。以上の結果から、KB425796-C の作用が真菌細胞壁とくに mannoprotein に対するものである可能性が示唆され、真菌に対する選択的な作用が期待された (42, 43)。

第三章においては、本章で得られた結果にもとづき、KB425796-C の *T. asahii* および *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける感染防御効果について評価し、治療薬としての可能性について論じた。

第三章 新規抗真菌物質 KB425796-C の生物学的活性

Aspergillus 属による感染症の報告は近年増加傾向にあり深在性真菌症のなかで最も重要な感染症である⁽⁴⁾。一方 *Trichosporon* 属感染症はおもに *T. asahii* による感染により発症するが、これも *Aspergillus* 感染症同様、コンプロマイズド・ホストにおいて感染のリスクのある重篤な感染症の一つである。全身性の *Trichosporon* 感染症を単剤で治療する試みも種々なされているものの、現在までに十分満足な結果は得られていない^(44, 45)。加えて、本邦で市販されている抗真菌剤は 9 種(Table 0-1)に留まっており、選択肢は未だ少ない。上記のような感染症に対する満たされない治療ニーズのために、新規の安全で効果的な治療薬の開発が望まれている。

真菌細胞の細胞壁は哺乳類細胞には存在しない構造であり^(42, 46)、それを構成する β -1,3-glucan、chitin および種々の mannoprotein 等は真菌細胞特有の構成成分であることから、抗真菌剤の標的として魅力的である。例えば、真菌細胞壁の主成分の一つである β -1,3-glucan 合成を阻害するキャンディン系抗真菌剤である Micafungin は、*Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して優れた抗真菌作用を有することが知られている。chitin 合成を阻害する化合物としては Nikkomycin 類が知られており、Nikkomycin Z と Micafungin は *A. fumigatus* に対して *in vitro* および *in vivo* で相乗的に作用する事が知られている^(23, 38)。また、*T. asahii* に対して、Micafungin 単独では *in vitro* でも作用を示さないが⁽⁴⁰⁾、Fluconazole と併用することで、*in vivo* 感染モデルで一定の効果が得られることが示されている⁽⁴¹⁾。これらの事から、作用機序の異なる 2 つの薬剤を併用することで、現行療法では十分な効果が得られない真菌感染症に対して、高い効果が得られる可能性が考えられる。

第二章では KB425796-A 類縁体の中から、より作用の強い KB425796-C を取得した(Fig. 3-1)。第三章では、KB425796-C の Micafungin 併用による *A. fumigatus* に対する殺真菌作用を詳細に解析するとともに、*T. asahii* および *A. fumigatus* 全身感染モデルにおける治療効果について評価した。

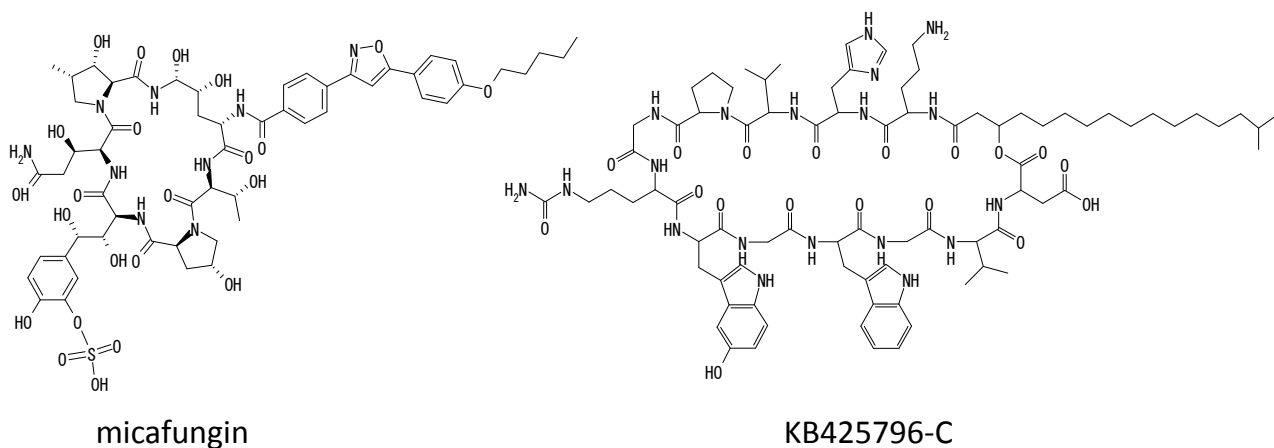


Fig. 3-1 Micafungin と KB425796-C の構造

材料及び方法

化合物

Micafungin および Voriconazole は Astellas Pharma, Inc.にて合成取得した。Nikkomycin X は Astellas Pharma, Inc.にて培養精製した。Amphotericin B(AMPH)は Bristol-Myers Squibb より購入した。

抗真菌活性の測定方法

各薬剤の抗真菌活性は第一章と同様の方法で測定した。顕微鏡にて試験菌の増殖および形態変化を観察し、菌の増殖を抑制する効果が見られる最小濃度を MEC : minimum effective concentration、菌の増殖を完全に阻害する最小濃度を MIC : minimum inhibition concentration とし、各値を求めた。

チェッカーボードアッセイ

各薬剤の相互作用（相乗、相加、相互作用なし、拮抗）は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)の推奨⁽⁴⁷⁾に則り、チェッカーボード希釈系列法を用いて評価した。96 ウェル平板 microtiter plate(住友ベークライト)を使用し、最終濃度の 4 倍濃度に培養培地で希

積した各薬剤 (KB425796-C および Micafungin) を準備し、薬剤濃度の組み合わせに従って 25 μ L ずつ各ウェルに添加した。各薬剤単独および薬剤なしのウェルには、含まない薬剤の代わりに培地のみを添加した。抗真菌活性の測定方法で記載した方法に従い *A. fumigatus* 孢子懸濁液を調製し、50 μ L ずつ各ウェルに添加した。以上により各ウェル全体で 100 μ L とした。薬剤および孢子懸濁液を添加した microtiter plate を 37°C で 48 時間培養した。Alamar Blue 染色 (Iwaki glass Co., Ltd) および顕微鏡観察により、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を評価した。

各薬剤併用および単剤の MIC : minimum inhibition concentration は Alamar Blue 染色の吸光度がコントロールウェル (薬剤なし) に比べて >90% 減少した最小の薬剤濃度とした。MEC : minimum effective concentration は顕微鏡にて試験菌の増殖および形態変化を観察し、菌の増殖を抑制する効果が見られる最小の薬剤濃度とした。薬剤の相互作用は fractional inhibitory concentration (FIC) index によって、相乗的、相加的、相互作用なし、拮抗の判定を行った。FIC は各薬剤の併用時の MIC (MEC) を単剤の MIC (MEC) で割った値であり、各薬剤の FIC の和が FIC index である。FIC index が <1.0 の場合は相乗的、=1.0 の場合は相加的、1.0-2.0 の場合は相互作用なし、>2.0 の場合は拮抗と判定した。

Time-kill curve アッセイ

最終濃度の 2 倍濃度に培養培地で希釈した各薬剤を準備し 96 ウェル平板 microtiter plate に 50 μ L ずつ添加した。抗真菌活性の測定方法で記載した方法に従い *A. fumigatus* 孢子懸濁液を調製し、50 μ L ずつ各ウェルに添加した。薬剤および孢子懸濁液を添加した microtiter plate を 37°C で 48 時間培養した。Fig. 3-3 で示した時間ごとに colony formation アッセイを行った。すなわち、あらかじめ 20 mL の PDA 培地を添加後 40°C 程度に冷却した 10 cm 培養ディッシュを準備し、培養した各ウェルから菌体を含む培養液全量を 96 ウェル microtiter plate から採取し、上記の 10 cm 培養ディッシュに添加した。この培養ディッシュをよく攪拌したのち、37°C で 24 時間培養し、生育してきた colony を数え、培養ディッシュあたりの colony formation unit(CFU)を測定した。

***T. asahii* 全身感染マウスモデルおよび *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルを用いた KB425796-C の *in vivo* 感染防御効果の評価**

動物実験は Astellas Pharma Inc.の動物実験委員の承認の手技にしたがって実施した。*T. asahii* FP2044 は PDA 斜面培地で一昼夜培養し、滅菌した生理的食塩水で菌体を懸濁し回収した。1000 rpm、5 分遠心し、上清を捨て、生理的食塩水で 1.0×10^8 cells/mL になるよう希釈した。この菌懸濁液を 7 週齢の DBA/2 マウス（雌、Charles river）に対して尾静脈より 100 μ L 接種した（ 1.0×10^7 cells/マウス）。*A. fumigatus* FP1305 は PDA 斜面培地で四昼夜培養し、滅菌した生理的食塩水で菌体を懸濁し、滅菌したガーゼで濾過した。得られた孢子懸濁液を 1000 rpm、5 分遠心し、上清を捨て、生理的食塩水で 1.6×10^7 spores/mL になるよう希釈した。この孢子懸濁液を 7 週齢の DBA/2 マウス（Charles river）に対して尾静脈より 100 μ L 接種した（ 1.6×10^6 spores/マウス）。Micafungin は生理的食塩水に溶解した。Amphotericin B は 5% glucose を含む生理的食塩水に溶解した。KB425796-C および Nikkomycin X は 10% HCO-60(polyoxyethylene (60) hydrogenated castor oil)を含む生理的食塩水に溶解した。Micafungin および Nikkomycin X は皮下に、KB425796-C および Amphotericin B は腹腔内に投与した（各群 n=5）。*Trichosporon* 感染モデルにおいては、菌液接種 1 時間後に薬剤投与を開始し、1 日 2 回、3 日間連続投与した。*Aspergillus* 感染モデルにおいては菌液接種 1 時間後に薬剤投与を開始し、1 日 1 回、5 日間連続投与した。マウスの生死を毎日判定し Kaplan-Meier プロットを作成し、ログランク検定により検定した。

***A. fumigatus* 全身感染マウスモデルを用いた KB425796-C と Micafungin の併用による *in vivo* 治療効果および組織内生菌数の評価**

上記と同様に、*A. fumigatus* 孢子懸濁液を調製した。各群 10 匹、8 群の DBA/2 マウス（雌、7 週齢、Charles river）に 2.0×10^6 spores/マウスになるように *A. fumigatus* 孢子懸濁液を接種し、各群下記のように薬剤を投与した。①Amphotericin B 1 mg/kg、腹腔内投与、1 日 1 回 ②Micafungin 0.1, 0.32, 1 mg/kg、皮下投与、1 日 1 回 ③Micafungin 0.1, 0.32, 1 mg/kg、皮下投与、1 日 1 回 + KB425796-C 32 mg/kg、腹腔内投与、1 日 2 回 ④生理的食塩水 腹腔内投与、1 日 2 回。薬剤は *A. fumigatus* 孢子懸濁液を接種した翌日および翌々日の 2 日間投与した。各群中 5 匹を

最終投与の翌日に解剖し、無菌下で肝臓および腎臓を摘出し、臓器重量を測定した。摘出した各臓器は 5 mL の生理的食塩水中で、ポリトロンホモジナイザー（KINAMATICA AG）を用いて破碎した。破碎液を 10 倍、100 倍、1000 倍に希釈し、PDA 培地を添加した培養ディッシュに播種し、48 時間、37℃で培養した。生育してきたコロニーをカウントし、臓器重量 1 g あたりの CFU を算出した。各群の残り 5 匹については 31 日間、生死について経過観察を行い、Kaplan-Meier プロットを作成し、ログランク検定により検定した。各臓器の CFU については Student's t-検定により検定した。

各臓器中の薬剤濃度の評価

KB425796-C の各臓器中の薬剤濃度は以下のように測定した。ICR マウス（雌、4 週齢、Charles river）に KB425796-C を 32 mg/kg 1 日 2 回、2 日間腹腔内投与した。初回投与の 30 分、4 時間および 48 時間後にマウスを解剖し、肝臓、腎臓、肺、脾臓、脳を摘出した。摘出した各臓器の重量を測定し、5 倍量(v/w)のメタノールを添加し、ポリトロンホモジナイザーで破碎した。破碎液を 15000 rpm、10 分遠心し、上清中の KB425796-C を HPLC 分析（測定波長 280 nm）で測定し、臓器 1 g 中の KB425796-C 量を算出した。HPLC 分析の検出限界は 10 ug/mL であった。各臓器、時間ごとに n=3 で測定し、その平均値を求めた。

結果

チェッカーボードアッセイによる micafungin と KB425796-C の相乗作用の定量

KB425796-C は KB425796-A と同様の形態変化を *A. fumigatus* 菌糸に誘導した（第二章参照）。顕微鏡観察では、Micafungin および KB425796-C はともに *A. fumigatus* に対して単剤では静菌的に作用した。Micafungin は細かく分岐を繰り返す形態変化を誘導し、KB425796-C は菌糸の球形の膨張を形成した。2 つの薬剤を併用した場合には胞子が球形に膨張し破裂する様子が見られた。方法の項に記載した基準にしたがって MIC、MEC を決定し、isobologram をプロットし

た (Fig. 3-2)。そこから、MIC、MEC の代表値を用いて FIC index を算出した (Table 3-1)。各薬剤単独では静菌的な作用に留まるのに対して併用することで殺真菌作用が得られることから、MIC の FIC index については顕著な相乗作用を示す値が得られた。MEC についても相乗作用を示す値であった。

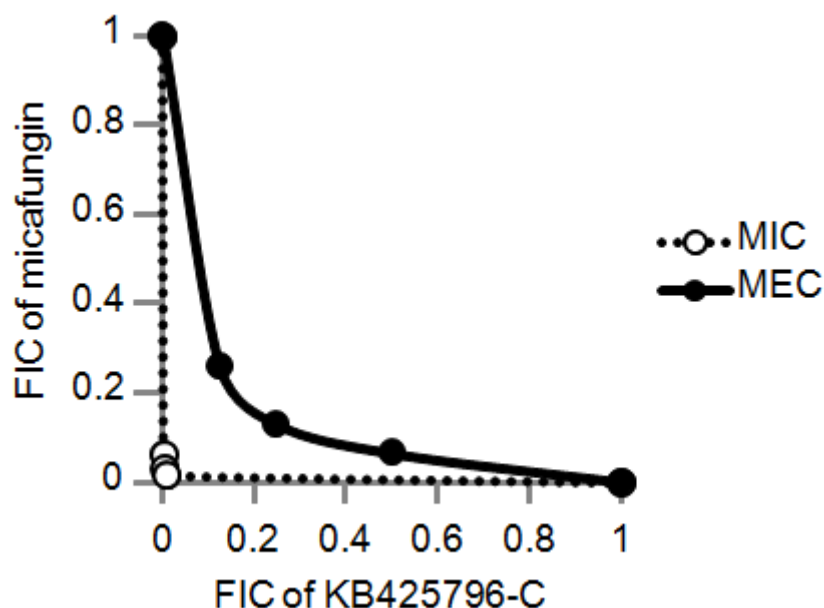


Fig. 3-2 KB425796-C と Micafungin の併用時の FIC

A. fumigatus に対する抗真菌作用における KB425796-C と micafungin の相関を isobologram で示した。軸は各薬剤の FIC 値を示した。

Table 3-1. Micafungin と KB425796-C の *A. fumigatus* に対する抗真菌作用の相関

	Agent alone		Agent combined		FIC index	Effect
	KB425796-C	micafungin	KB425796-C	micafungin		
MEC (μg/ml)	3.1	0.004	0.4	0.001	0.38	synergistic
MIC (μg/ml)	>50	>0.5	3.1	0.001	<0.064	synergistic

Time-kill curve アッセイによる micafungin と KB425796-C の殺真菌作用の評価

Micafungin および KB425796-C を単剤または併用で 17 時間、24 時間、42 時間、48 時間作用させた際の *A. fumigatus* の生存細胞数をプロットした (Fig. 3-3)。0.05 $\mu\text{g/mL}$ Micafungin は 48 時間で 70% の CFU 抑制に留まった。また 2 $\mu\text{g/mL}$ KB425796-C は 40% 抑制であった。また殺菌的な薬剤とされる Voriconazole は単剤で 2 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理で 97% の CFU 抑制であった。これに対し 0.05 $\mu\text{g/mL}$ Micafungin と 4 $\mu\text{g/mL}$ KB425796-C 併用では 24 時間の時点で 99% 以上、48 時間で 99.99% 以上の CFU 抑制が得られ、Voriconazole 単剤を上回る CFU 低下作用が得られたことから、殺菌作用を有している事が確かめられた。

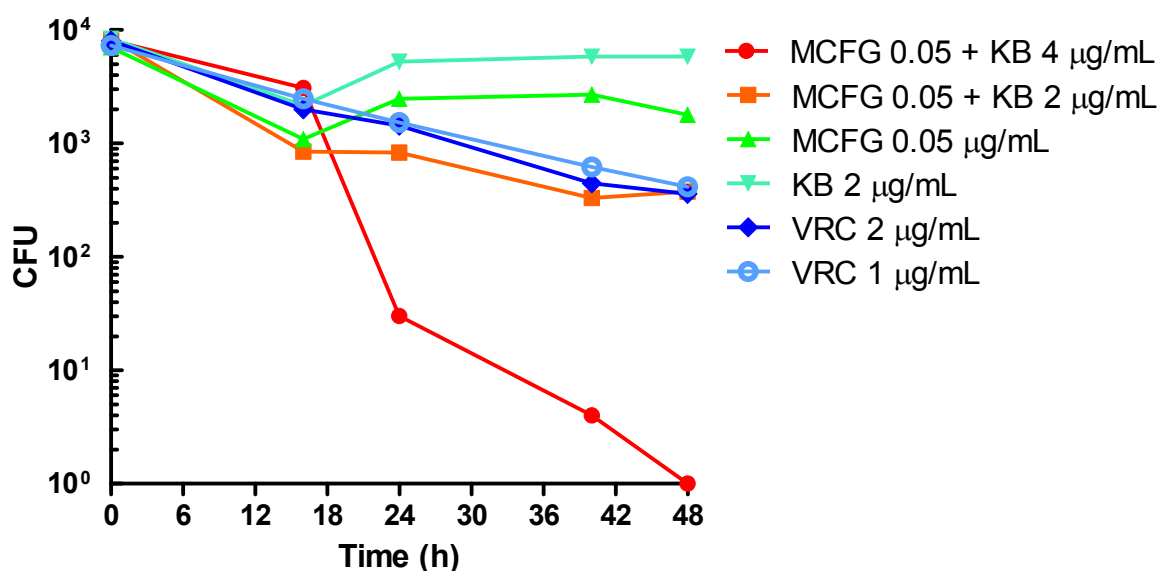


Fig. 3-3 Time-kill curve

Micafungin (MCFG), KB425796-C (KB), Voriconazole (VRCZ) の *A. fumigatus* に対する殺真菌作用を Time-kill curve プロットで表した。

T. asahii 全身感染マウスモデルおよび *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルを用いた KB425796-C の *in vivo* 感染防御効果

第二章において KB425796-C は *T. asahii* に対して単剤で強い抗真菌作用を有する事を示した (MEC=1.56 $\mu\text{g/mL}$, MIC=3.13 $\mu\text{g/mL}$)。また *A. fumigatus* に対しても単剤で抗真菌作用を示した (MEC=3.13 $\mu\text{g/mL}$, MIC>50 $\mu\text{g/mL}$)。そこでまず、単剤で強い *in vitro* 抗真菌作用が見られた *T.*

asahii について *in vivo* での効果を調べる目的で、*T. asahii* 全身感染マウスモデルを構築し、KB425796-C を腹腔内投与した際の感染防御効果を調べた。*T. asahii* 全身感染マウスモデルにおける生存曲線を Fig. 3-4 に示した。14 日間の評価で KB425796-C の ED₅₀ は 12.5 mg/kg であった。このモデルにおいて、32 mg/kg の KB425796-C は 1 mg/kg の Amphotericin B および 5 mg/kg の Micafungin を上回る感染防御効果が得られ、5 匹中全例が評価期間中生存した。

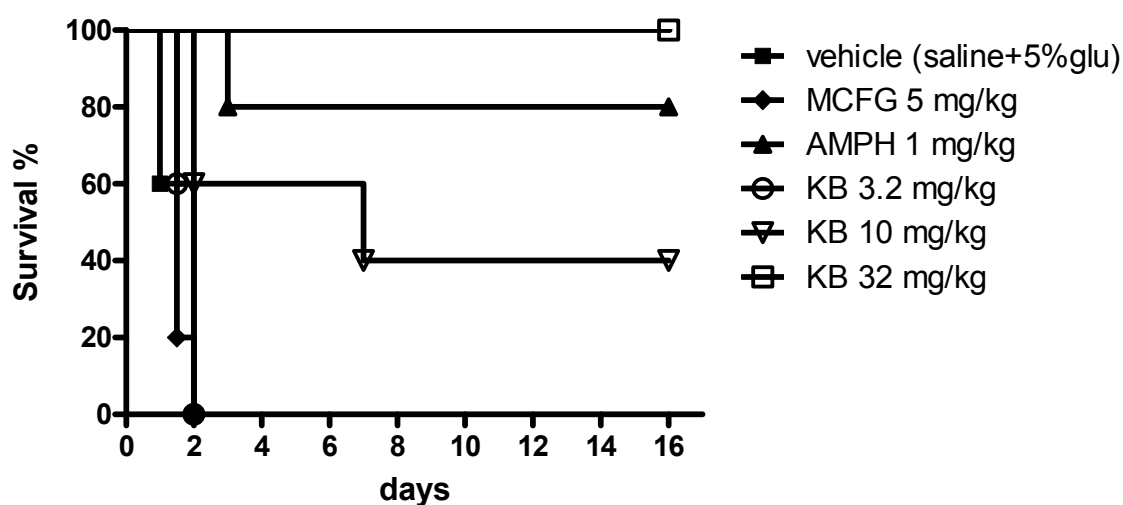


Fig. 3-4 *T. asahii* 全身感染マウスモデルにおける感染防御効果

各用量の Amphotericin B (AMPH), micafungin (MCFG), KB425796-C (KB)を投与した際の *T. asahii* 全身感染マウスモデルにおける観察期間中のマウスの生存率をプロットした。

次に *A. fumigatus* に対する単剤での *in vitro* の作用が *in vivo* にどのように反映されるか調べる
 目的で、*A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける KB425796-C、Micafungin、Nikkomycin X
 の感染防御効果を調べ、その生存曲線を Fig. 3-5 に示した。0.1 mg/kg の Micafungin を投与した
 群は 5 匹中全例が評価期間中生存した。32 mg/kg の KB425796-C を投与した群は、薬剤なしの
 群に比べて有意に生存期間が延長した ($P<0.05$)。

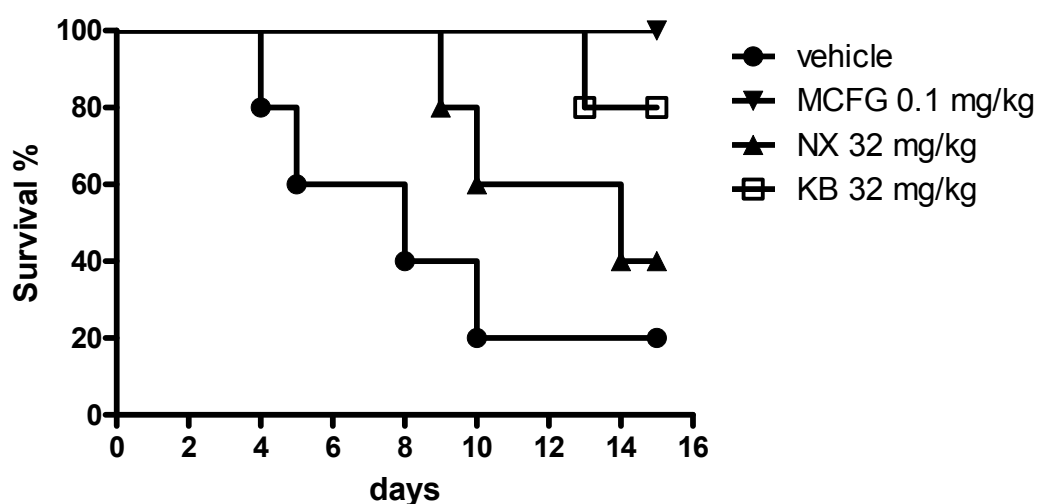


Fig. 3-5 *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける感染防御効果

各用量の Nikkomycin X (NX), KB425796-C (KB), Micafungin (MCFG)を投与した際の *A. fumigatu* 全身感染
 マウスモデルにおける観察期間中のマウスの生存率をプロットした。

A. fumigatus 全身感染マウスモデルを用いた KB425796-C と Micafungin の併用による *in vivo* 治療効果

次に *in vitro* における KB425796-C と Micafungin 併用による *A. fumigatus* に対する殺菌的な作用が、*in vivo* にどのように反映されるか調べる目的で *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける長期の生存に与える効果を、KB425796-C と Micafungin の併用条件下で評価した。投与開始を1日後とし、投与日数を2日間と少なくし、観察期間を長期にすることで、殺菌的な薬剤が効果を発揮しやすい実験条件を設定した。薬剤投与後のマウスの生存を観察した結果を Kaplan-Meier プロットに示した (Fig. 3-6)。 *A. fumigatus* 感染後4日目から6日目にかけて、生理的食塩水処置群のマウスが全例死亡した。32 mg/kg の KB425796 単剤処置では本条件では有意な延命効果は見られなかった(data not shown)。Micafungin 処置群では生理的食塩水処置群よりも評価期間中の死亡例が少なく、1 mg/kg Amphotericin B 処置群では評価期間中全例が生存した。ログランク検定の結果、0.1 mg/kg Micafungin 処置群で生理的食塩水処置群に比べて有意な生存期間の延長が見られた ($P<0.01$)。また、0.1 mg/kg Micafungin と 32 mg/kg KB425796-C 併用処置群では、0.1 mg/kg Micafungin 単剤処置群よりも生存期間の延長傾向が見られた ($P=0.085$)。

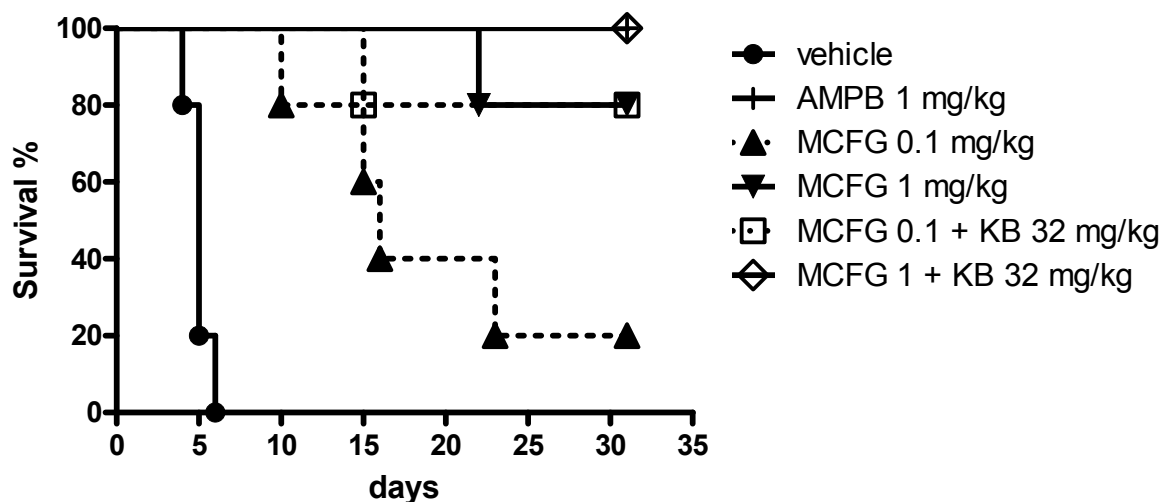


Fig. 3-6 *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける長期の感染防御効果

各用量の Amphotericin B (AMPB), Micafungin (MCFG), KB425796-C (KB) を単独もしくは併用にて投与した際の *A. fumigatu* 全身感染マウスモデルにおける観察期間中のマウスの生存率をプロットした。

A. fumigatus 全身感染マウスモデルにおける組織内生菌数の評価

上記の治療効果評価のモデルと同様の方法で *A. fumigatus* 感染および薬剤投与したマウスに

ついて、感染後 3 日目のマウスを解剖し、腎臓および肝臓を摘出し、その組織内菌体の CFU を測定した(Fig. 3-7)。臨床では *Aspergillus* 属の場合は肺に感染する事が多いが、菌を静脈から接種したマウスモデルでは腎臓や肝臓に菌が集まる傾向がある事、肺は CFU 測定に用いるために十分な破碎処理が困難であった事から、本実験では腎臓と肝臓について評価した。腎臓内 CFU について、1 mg/kg Micafungin 処置群および 1 mg/kg Amphotericin B 処置群では生理的食塩水処置群よりも有意な減少が見られた (いずれも $P<0.01$)。0.32 mg/kg Micafungin と 32 mg/kg KB425796-C 併用処置群では 0.32 mg/kg Micafungin 単剤処置群と比べ腎臓内 CFU の有意な減少が見られたが($P=0.016$)、その他の用量の組み合わせでは、併用による効果の増強は見られなかった。一方、肝臓内 CFU については、生理的食塩水処置群と Micafungin 単剤処置群を比較した場合の CFU の減少効果は、腎臓内 CFU のそれと比較して小さいものであった。しかし、Micafungin と KB425796-C を併用することにより、いずれの用量の組み合わせにおいても有意な CFU の減少が見られた (いずれも $P<0.01$)。この Micafungin と KB425796-C 併用による肝臓内 CFU 抑制作用は、殺菌的薬剤である 1 mg/kg Amphotericin B よりも強いものであった。

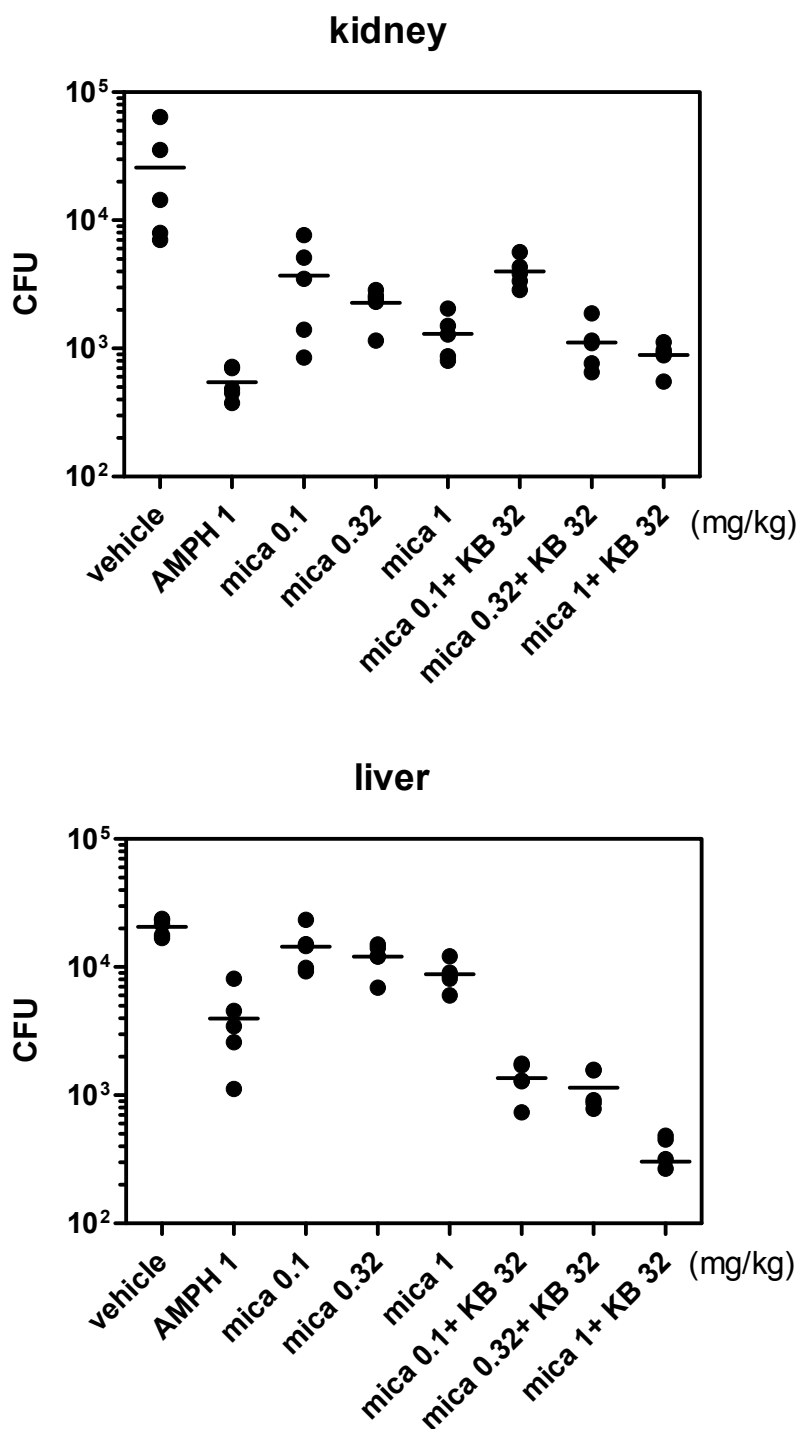


Fig. 3-7 *A. fumigatus* 全身感染マウスモデルにおける組織内生菌数

各用量の Micafungin (mica), Amphotericin B (AMPH), KB425796-C (KB)を単独もしくは併用にて投与した際の *A. fumigatu* 全身感染モデルマウスより摘出した腎臓（上図）および肝臓（下図）から回収した *A. fumigatu* 菌体の CFU を散布図で表した。

各臓器中の薬剤濃度分布の比較

前述の腎臓と肝臓における CFU の減少効果の違いについて、各臓器内の薬剤濃度の差に起因する可能性が考えられたことから、KB425796-C 投与後の各臓器内の薬剤濃度を検討した。KB425796-C を ICR マウスに投与し肝臓、腎臓、肺、脾臓、脳の臓器中の薬剤濃度を測定した結果を Fig. 3-8 に示した。脳内の KB425796-C は投与後 48 時間でのみ検出され、その他の時点では検出されなかった。その他の臓器では、投与 30 分後では、どの臓器でもほぼ同じ濃度であった。特徴として、肝臓では、4 時間、48 時間と経時的に増加しており、4 時間後には腎臓、肺、脾臓の 2.5 倍であり、48 時間後には腎臓、肺の 10 倍の濃度に増加した。

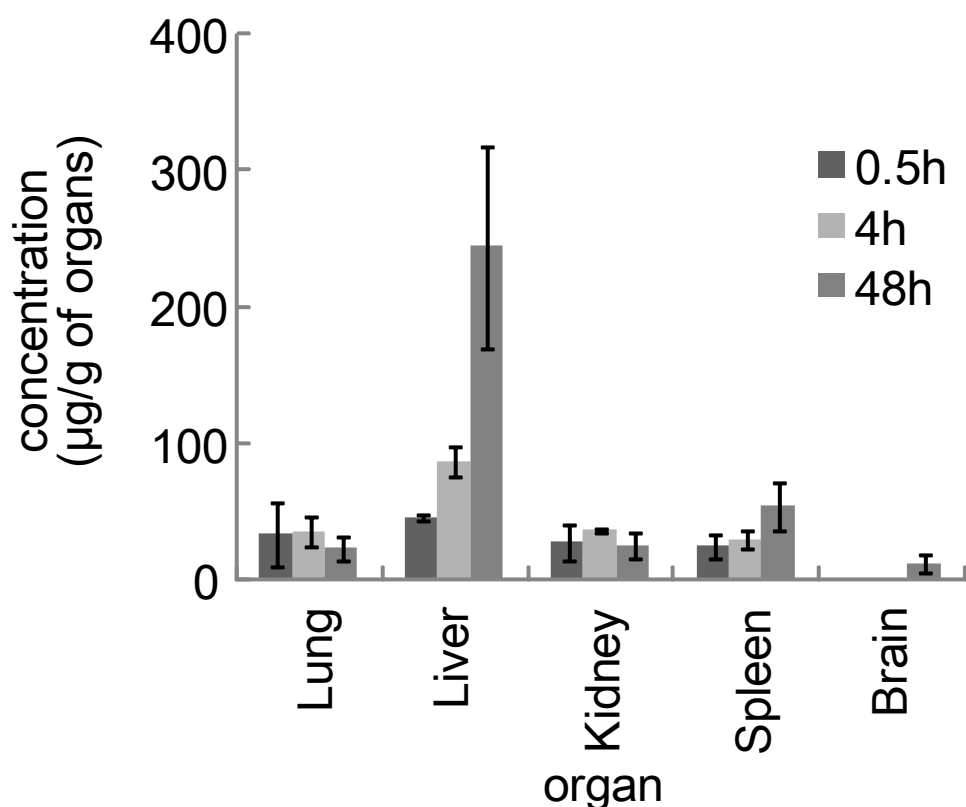


Fig. 3-8 各臓器中の KB425796-C の濃度

KB425796-C (32 mg/kg) を腹腔内投与した ICR マウスの各臓器における KB425796-C 濃度を示した。

考察

第三章では、KB425796-C の *in vitro* および *in vivo* 作用について、単剤使用時と Micafungin 併用時の両方について評価した。KB425796-C は抗 *Aspergillus* 作用および抗 *Trichosporon* 作用を *in vitro*、*in vivo* で発揮し、これら真菌による感染症の治療薬としての可能性が示された。

深在性 *Trichosporon* 症は、主に免疫不全状態の人に対して感染することで発症し、例数は少ないものの致死的な転機をたどる事が多い重要な病態である。*Trichosporon* 属は一般に Amphotericin B、Micafungin、Fluconazole 等の既存の抗真菌薬に対して低感受性であることから⁽⁴⁸⁾、現在までに深在性 *Trichosporon* 症に対する治療法は満足と言えるものは確立されていない。本研究では、*T. asahii* 臨床分離株を用いたマウス全身感染モデルを作製し、本モデルに対して Micafungin は臨床で使用される用量よりもはるかに高い用量でも効果が無く、また Amphotericin B も毒性を回避した限界の用量でも完全には感染防御できない事を示した。それに対して、KB425796-C は本モデルにおいて用量依存的に感染防御効果を示し、32 mg/kg では 100%の生存を示した。以上の結果は、KB425796-C が深在性 *Trichosporon* 症における治療薬として魅力的な薬剤であることを示唆するものである。

次に真菌症の主要な原因真菌の一つである *A. fumigatus* に対する KB425796-C の作用について検討した。第二章の検討において、KB425796-C は *A. fumigatus* 菌糸の膨張を誘導し、Nikkomycin X と類似の形態変化を示し、また酵母遺伝子欠損株のスクリーニングより mannoprotein に関連した作用である可能性が示唆された。また Nikkomycin Z は Micafungin と併用することで、*A. fumigatus* に対して相乗的に作用する事が示されているが、本研究においては KB425796-C および Nikkomycin X が Micafungin と併用することで *A. fumigatus* に対して球形に膨張したスフェロプラスト様の形態を誘導することを発見した。そこで第三章では *in vitro* での Micafungin との併用作用についてさらに詳細に検討すべく、KB425796-C と Micafungin 併用の抗 *A. fumigatus* 活性についてチェッカーボードアッセイを行った。その結果、Micafungin および KB425796-C は単剤ではいずれも静菌的作用であるが、Alamar Blue アッセイにおいて Micafungin 単剤は 0.5 µg/mL で 80%生育阻害、KB425796-C 単剤は 6.1 µg/mL で 20%生育阻害と、

efficacy に違いが見られた。一方、併用時には広い範囲の薬剤濃度で *A. fumigatus* の生育はほぼ 100% 阻害された。この条件下ではスフェロプラスト様の形態変化がみられ、さらに時間において観察すると、そのスフェロプラスト様の菌糸が破裂する様子が観察された。FIC index として数値化すると、MEC をエンドポイントとすると 0.38、MIC をエンドポイントとすると 0.064 と、いずれも相乗的な作用であることを示したが、MIC のものの方がはるかに小さい値であった。これは、いずれも単剤では静菌的な作用であるため最高用量でも MIC に到達しないが、併用時には低濃度で完全な生育阻害が得られる事により FIC index としては顕著に低い数値になる事に起因する。

上記のようにチェッカーボードアッセイで 100% 近い生育阻害が見られ、スフェロプラスト様の菌糸が破裂するような形態が見られたが、さらにこれが殺菌的な作用であることを確認する目的で Time-kill curve アッセイを行った。Micafungin は *C. albicans* に対しては殺菌的であるが *A. fumigatus* に対しては静菌的であるとされる^(40, 49)。これを裏付けるように、Time-kill curve アッセイにおいて 0.05 µg/mL Micafungin は 48 時間で 70% の CFU 抑制に留まった。また 2 µg/mL KB425796-C は 40% 抑制であった。これに対し 0.05 µg/mL Micafungin と 4 µg/mL KB425796-C 併用では 24 時間の時点で 99% 以上の CFU 抑制が得られ、殺菌的な薬剤とされる Voriconazole を上回る CFU 低下作用が得られた。以上の結果は Micafungin と KB425796-C の併用が、*A. fumigatus* に対して殺菌的に作用している事を明確に示すものである。

次に、KB425796-C が *in vivo* でも抗 *A. fumigatus* 作用を発揮しうるか調べた。*A. fumigatus* 全身感染マウスモデルを作製し評価した結果、KB425796-C は 32 mg/kg で有意な生存期間の延長が見られ、また Nikkomycin X 32 mg/kg よりも強い効果が見られた。しかしながら Micafungin では 0.1 mg/kg で 100% の生存が見られるのに比べると、その効果は弱いものであった。前述のように *in vitro* でも抗 *A. fumigatus* 作用の efficacy は Micafungin のほうが KB425796-C を上回っており、この efficacy の差が *in vivo* の感染防御作用の強さにも影響したものと推測される。

In vitro では Micafungin と KB425796-C は併用することで強い相乗作用を示し、かつ殺菌的な作用が付与されたことから、*in vivo* でもこの作用が反映されるかを調べることにした。そこで *A. fumigatus* 感染モデルにおいて、投与開始を 1 日後とし、投与日数を 2 日間と少なくし、観察

期間を長期にすることで、殺菌的な作用、すなわちマウス体内から菌が十分に除去されたかどうか反映されやすい評価系を用いた。評価の結果、Micafungin 1 mg/kg では 80%のマウスが 32 日間の評価期間中に死亡したのに対して、Amphotericin B 1mg/kg および Micafungin 1 mg/kg と KB425796-C 32 mg/kg の併用で処置した群においては 100%のマウスの生存が確認された。Amphotericin B は殺菌的な薬剤として代表的なもののひとつであり、本評価系において殺菌的な作用が重要であることを支持する結果となり、また Micafungin と KB425796-C の併用による殺菌的な作用が *in vivo* でも発揮されている事が示唆された。

Micafungin および Amphotericin B は *C. albicans* 感染マウスモデルにおいて腎臓内の生菌数を⁽⁵⁰⁾、また *A. fumigatus* 肺感染マウスモデルにおいて肺内の生菌数を減らす作用がある^(51, 52)ことが知られている。臨床では *Aspergillus* 属の場合は肺に感染する事が多いが、菌を尾静脈から接種したマウスモデルでは腎臓や肝臓に菌が集まる傾向がある事、および肺内の菌数を測定する事が実験手技的に困難であったことから、本研究では肝臓と腎臓の臓器内生菌数を評価した。上述の Micafungin と KB425796-C の併用による生存期間を評価したモデルにおけるマウスから肝臓と腎臓を摘出し生菌数を評価した結果、生存期間の評価結果と同じく、Amphotericin B 群および Micafungin と KB425796-C の併用群で有意な生菌数の減少が見られた。興味深いことに、肝臓においてはいずれの用量においても Micafungin に対して KB425796-C を追加することで有意な生菌数の減少が見られた。さらに、薬剤の組織内分布を調べてみたところ、KB425796-C は他臓器に比べて明らかに肝臓内の濃度が高く、肝臓内で生菌数を減少させる効果が高かった原因が、薬剤濃度の偏りによるものであることが示唆された。前述のように *Aspergillus* 感染症の標的となる主な臓器は肺であることから、臨床での有効性を求めるためには薬剤は肝臓に蓄積せず、肺でより効果を発揮する事が望まれる。また KB425796-C は微生物由来の抗真菌物質としては比較的良好な薬物動態プロファイルを有する化合物であるが、医薬品として代謝安定性や安全性の面で考えた場合には肝臓への蓄積性は改善せねばならない点であると言える。

本章では KB425796-C と Micafungin の *in vitro* での相乗作用および *T. asahii* 感染マウスモデル、*A. fumigatus* 感染マウスモデルに対する有効性について述べた。ここで得られた結果は、KB425796-C が Micafungin との併用による優れた抗真菌剤を開発するためのリード化合物とな

り得ることを示すものであるが、実用化にはさらなる有効性の向上と薬物動態の改善にむけた研究が必要である。

総括

本研究では、死に至る危険性のある疾患でありながら未だ治療薬の選択肢が少ない深在性真菌症の治療薬を探索すべく、微生物の生産する二次代謝産物から新規の抗真菌剤の取得を試みた。

第一章において、青森県十和田湖周辺土壌から分離したバクテリア 530603 株が生産する新規抗真菌物質 KB425796-A を発見し、その単離精製方法を確立し化学構造を決定した。またその生産菌 530603 株について分類学的解析を行い、*Paenibacillus* 属であることを同定した。

第二章においては、KB425796-A と Micafungin の併用により *A. fumigatus* が球形に膨張する特徴的な形態変化を見出し、この形態変化を指標に 530603 株培養液から KB425796-A 類縁体を複数単離し、それらの化学構造を決定した。得られた類縁体の抗真菌活性について評価し、構造活性相関について考察するとともに、KB425796-A よりも抗 *A. fumigatus* 活性が強く生産量の多い KB425796-C について、*in vitro* の抗真菌活性を詳細に評価した。その結果、KB425796-C が *T. asahii* に対して強い抗真菌活性を有する事、*A. fumigatus* に対して Micafungin との併用で活性の増強が見られる事が見出された。またその作用機序については *A. fumigatus* 菌糸の形態変化の観察および酵母遺伝子欠損株に対する抗真菌作用の検討より、KB425796-A が真菌細胞壁構成成分のうち mannoprotein の生合成に関与することを示唆する知見を得た。

第三章においては、まず KB425796-C が最も強い抗真菌作用を示す *T. asahii* について、その抗真菌作用が *in vivo* でも発揮されることを確認するために *T. asahii* 感染マウスモデルを用いて評価を行い、Amphotericin B 等の既存薬剤を上回る感染防御効果が得られる事を示した。次に、よりニーズの大きい *A. fumigatus* に対する *in vitro* および *in vivo* 作用を詳細に検討した。チェックボードアッセイおよび Time-kill curve アッセイによって、KB425796-C と Micafungin が *A. fumigatus* に対して相乗的に作用し、その併用による作用は殺菌的なものであることを確認した。また、*A. fumigatus* 感染マウスモデルを用いて評価を行い、KB425796-C が単剤でも一定の感染防御効果を示すのに加えて、Micafungin と併用する事で、長期の延命が得られ、臓器内の生菌数も減少させることを確認した。これらの結果から、KB425796-C が *T. asahii*、*A. fumigatus* い

ずれに対しても *in vitro* で示された抗真菌作用を *in vivo* でも発揮しうる化合物であることが示された。

近年は主な深在性真菌症として *C. albicans* 感染症に代わって *A. fumigatus* 感染症が台頭してきているが、その治療薬のうち、Micafungin には *Aspergillus* 属に対しては静菌的な作用に留まる課題があり、Voriconazole では薬物相互作用の問題の他に、高頻度の視覚障害の副作用が現れる等により使用が制限されるという課題がある。また、深在性 *Trichosporon* 症は、例数は少ないものの致死的な転機をたどる事が多い重要な病態であるが、一般に既存の抗真菌薬に対して低感受性であることから、現在までに満足と言える治療法は確立されていない。これら課題に対し、本研究で示された KB425796-C の *in vivo* 抗真菌作用は、深在性 *Aspergillus* 症および深在性 *Trichosporon* 症における新たな治療方法を提供できる可能性を示したものであると言える。

一方で KB425796-C を医薬品として実用化を目指すには、以下の点について今後さらなる研究が必要である。第一に KB425796-C の作用機序が明確ではない点である。Nikkomycin と類似の形態変化を誘導する事、Micafungin と併用によりスフェロプラスト様の形態変化が見られる事から、細胞壁合成を阻害している事が示唆され、また酵母遺伝子欠損株スクリーニング結果から、mannoprotein の生合成に関与することが示唆されたものの、KB425796-C 標的そのものを特定する結果は得られていない。標的を明らかにするには、今後、化合物と結合する標的タンパク質の探索や、その機能を阻害する活性について生化学的方法で検討する必要がある。第二に *A. fumigatus* 感染モデルにおいて腎臓内生菌数については Micafungin と KB425796-C の併用は 0.32 mg/kg と 32 mg/kg の用量でのみ減少効果が見られた点である。これは第三章で述べたように、KB425796-C の濃度が腎臓内では十分でないことに起因すると推測されるが、臨床において *A. fumigatus* の主な感染臓器は肺であり、肺と腎臓の KB425796-C 濃度分布はほぼ同等であった事から、臨床で用いた場合に十分な治療効果が得られない可能性がある。代謝安定性や安全性の面からも肝臓に蓄積が見られたことは問題である。したがって、実用化するためには、KB425796-C の各臓器への分布について改善する必要があると思われる。第三に KB425796-C の potency の弱さである。*T. asahii* 感染モデルにおいても、*A. fumigatus* 感染モデルにおいても、KB425796-C の有効用量は 32 mg/kg 付近であり、臨床で実用化されている抗真菌剤一般と比べ

ると 1 桁程度高い。Micafungin 等のキャンディン系抗真菌剤の合成研究においては、アシル側鎖部位の変換により活性の向上が得られている事、KB425796-A 類縁体の SAR においてもアシル側鎖の長短によって potency の強弱が見られることから、この部位の変換が potency の向上に有効である事が期待されるものの、KB425796-A 誘導体のような macrocyclic lipopeptidolactone 構造を化学合成的に変換することは一般に難易度が高い。しかしながら、Micafungin の合成でも実施されている酵素反応を組み合わせた合成研究などを応用する事により変換できる可能性がある。

本研究で見出した一連の KB425796-A 類縁体は、Micafungin との併用による優れた抗真菌剤を開発するためのリード化合物として有望であり、今後の有効性の向上と薬物動態の改善にむけた研究により医薬品として実用化が期待できるものである。

引用文献

- (1) Garber G. An overview of fungal infections. *Drugs*. 2001 Dec;61 Suppl 1:1-12.
- (2) 山口 英世：病原真菌と真菌症（改訂4版），南山堂，2007年
- (3) Suzuki Y, Kume H, Togano T, Kanoh Y, Ohto H. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: the data from 1989 to 2009 in the Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. *Med Mycol*. 2013 Jul;51(5):522-6.
- (4) Wade JC. Treatment of fungal and other opportunistic infections in immunocompromised patients. *Leukemia*. 1997 May;11 Suppl 4:S38-9.
- (5) Shoham S. Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 2013 Jun;27(2):305-16.
- (6) Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012 Dec 19;4(165):165rv13.
- (7) Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Sep;9(9):719-27.
- (8) Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Infect Dis*. 1990 Mar-Apr;12(2):308-29.
- (9) Maniwa T, Yamamoto Y. Antifungal activity and clinical efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome). *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2007 Feb;129(2):129-34.
- (10) Tassel D, Madoff MA. Treatment of *Candida* sepsis and *Cryptococcus* meningitis with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. *JAMA*. 1968 Oct 21;206(4):830-2.
- (11) Arai T, Mikami Y, Kawada T, Masuda K. Action mechanism of 5-fluorocytosine. IV. Morphological observation and development of the resistant cells. *Nihon Saikingaku Zasshi*. 1975 Jan;30(1):257.
- (12) Heel RC, Brogden RN, Pakes GE, Speight TM, Avery GS. Miconazole: a preliminary review of its therapeutic efficacy in systemic fungal infections. *Drugs*. 1980 Jan;19(1):7-30.
- (13) Saag MS, Dismukes WE. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Jan;32(1):1-8.

- (14) Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. *AIDS*. 1997 Dec;11(15):1839-44.
- (15) Higashiyama Y, Kohno S. Micafungin: a therapeutic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004 Jun;2(3):345-55.
- (16) Tokimatsu I, Kadota J. Efficacies and clinical roles of new antifungal agents. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47(3):155-9.
- (17) Yoshida M. Infectious diseases: progress in diagnosis and treatment. Topics: IV. Towards containing infectious diseases: 3. Development of new antifungal drugs. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 2012 Nov 10;101(11):3185-91.
- (18) Johnson LB, Kauffman CA. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar 1;36(5):630-7.
- (19) Lipke PN, Ovalle R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol*. 1998 Aug;180(15):3735-40.
- (20) Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17762-75.
- (21) Suzuki S, Isono K, Nagatsu J, Mizutani T, Kawashima Y, Mizuno T. A NEW ANTIBIOTIC, POLYOXIN A. *J Antibiot (Tokyo)*. 1965 May;18:131.
- (22) Chaudhary PM, Tupe SG, Deshpande MV. Chitin synthase inhibitors as antifungal agents. *Mini Rev Med Chem*. 2013 Feb;13(2):222-36.
- (23) Chiou CC, Mavrogiorgos N, Tillem E, Hector R, Walsh TJ. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3310-21.
- (24) Nishiyama Y, Hasumi Y, Ueda K, Uchida K, Yamaguchi H. Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2005 Jan;54(1):67-77.
- (25) Mikulska M, Viscoli C. Current role of echinocandins in the management of invasive aspergillosis. *Curr Infect Dis Rep* 2011 Dec;13(6):517-27.
- (26) Jimenez-Ortigosa C, Aïmanianda V, Muszkieta L, Mouyna I, Alsteens D, Pire S, Beau R,

Krappmann S, Beauvais A, Dufrene YF, Roncero C, Latge JP. Chitin synthases with a myosin motor-like domain control the resistance of *Aspergillus fumigatus* to echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Dec;56(12):6121-31.

(27) Xaio J, Kumazawa S, Yoshikawa N, Mikawa T, Sato Y. Dactylfungins, novel antifungal antibiotics produced by *Dactylaria parvispora*. *J Antibiot (Tokyo)* 1993 Jan;46(1):48-55.

(28) Sneath P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. Ed., 1986.

(29) Muramatsu H, Mokhtar S, Katsuoka M, Ezaki M. Phylogenetic analysis of immunosuppressant FK506-producing streptomycete strains. *Actinomycetologica* 2005;19:33-39.

(30) Tcherpakov M, Ben-Jacob E, Gutnick DL. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int J Syst Bacteriol* 1999 Jan;49 Pt 1:239-46.

(31) Kato A, Nakaya S, Kokubo N, Aiba Y, Ohashi Y, Hirata H, Fujii K, Harada K. A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A. I. Taxonomy, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 1998 Oct;51(10):929-35.

(32) Fujie A, Iwamoto T, Muramatsu H, Okudaira T, Nitta K, Nakanishi T, Sakamoto K, Hori Y, Hino M, Hashimoto S, Okuhara M. FR901469, a novel antifungal antibiotic from an unidentified fungus No.11243. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 2000 Sep;53(9):912-9.

(33) Fujie A, Iwamoto T, Muramatsu H, Okudaira T, Sato I, Furuta T, Tsurumi Y, Hori Y, Hino M, Hashimoto S, Okuhara M. FR901469, a novel antifungal antibiotic from an unidentified fungus No.11243. II. *In vitro* and *in vivo* activities. *J Antibiot (Tokyo)* 2000 Sep;53(9):920-7.

(34) Hatano K, Morishita Y, Nakai T, Ikeda F. Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antibiot (Tokyo)* 2002 Feb;55(2):219-22.

(35) Hanadate T, Wakasugi M, Sogabe K, Kobayashi T, Horita H, Kawamura I, Hori Y, Matsui K, Hoshino Y, Sou M. Evaluation of the safety and efficacy of micafungin in Japanese patients with deep mycosis: a post-marketing survey report. *J Infect Chemother* 2011 Oct;17(5):622-32.

(36) Uchida K, Nishiyama Y, Yokota N, Yamaguchi H. *In vitro* antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. *J Antibiot (Tokyo)* 2000 Oct;53(10):1175-81.

(37) Matsue K, Uryu H, Koseki M, Asada N, Takeuchi M. Breakthrough trichosporonosis in patients with

hematologic malignancies receiving micafungin. Clin Infect Dis 2006 Mar 15;42(6):753-7.

(38) Clemons KV, Stevens DA. Efficacy of micafungin alone or in combination against experimental pulmonary aspergillosis. Med Mycol 2006 Feb;44(1):69-73.

(39) Matsubara H, Sasaki RM. High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. Biochem Biophys Res Commun 1969 Apr 29;35(2):175-81.

(40) Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F, Kuwahara S. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother 2000 Jan;44(1):57-62.

(41) Serena C, Pastor FJ, Gilgado F, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of micafungin in combination with other drugs in a murine model of disseminated trichosporonosis. Antimicrob Agents Chemother 2005 Feb;49(2):497-502.

(42) Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. Annu Rev Microbiol 1994;48:471-97.

(43) Liu J, Balasubramanian MK. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. Curr Drug Targets Infect Disord 2001 Aug;1(2):159-69.

(44) Itoh T, Hosokawa H, Kohdera U, Toyazaki N, Asada Y. Disseminated infection with *Trichosporon asahii*. 1996 May-Jun;39(5-6):195-9.

(45) Moretti-Branchini ML, Fukushima K, Schreiber AZ, Nishimura K, Papaioordanou PM, Trabasso P, Tanaka R, Miyaji M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2001 Mar;39(3):161-4.

(46) Shepherd MG. Cell envelope of *Candida albicans*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 1984;15:7-25.

(47) Standards. NCfCL. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997.

(48) Steinbach WJ, Perfect JR. Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. Int J Infect Dis 2003 Mar;7(1):5-20.

(49) Watabe E, Nakai T, Matsumoto S, Ikeda F, Hatano K. Killing activity of micafungin against

Aspergillus fumigatus hyphae assessed by specific fluorescent staining for cell viability. Antimicrob Agents Chemother 2003 Jun;47(6):1995-8.

(50) Ikeda F, Wakai Y, Matsumoto S, Maki K, Watabe E, Tawara S, Goto T, Watanabe Y, Matsumoto F, Kuwahara S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2000 Mar;44(3):614-8.

(51) Matsumoto S, Wakai Y, Nakai T, Hatano K, Ushitani T, Ikeda F, Tawara S, Goto T, Matsumoto F, Kuwahara S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2000 Mar;44(3):619-21.

(52) Graybill JR, Bocanegra R, Gonzalez GM, Najvar LK. Combination antifungal therapy of murine aspergillosis: liposomal amphotericin B and micafungin. J Antimicrob Chemother 2003 Oct;52(4):656-62.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、終始暖かい激励と多くのご支援、ご指導を賜りました、指導教官である佐藤文彦教授に深く感謝しております。佐藤文彦教授には、筆者の京都大学農学部および生命科学研究科在学中より、ご指導を頂きました。研究者の道へ暖かく送り出していただき、またこのたび学位論文をまとめるという節目に当たり、再びこのような環境を与えてくださり、ご指導いただきましたことに、心より感謝申し上げます。

本論文作成に当たり、調査委員として多くのご助言を頂きました、福澤秀哉教授、永尾雅哉教授、ならびに専門委員として多くのご助言を頂きました、神戸大朋准教授には深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、日々の研究だけでなく多くのご指導をしていただき、辛抱強く見守って下さいました、独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬支援戦略室(元 アステラス製薬 醗酵研究所)藤江昭彦博士には深く感謝しております。研究だけでなく多岐にわたりご指導を賜りました、生化学工業株式会社(元 アステラス製薬 醗酵研究所 所長)稲村典明博士には深く感謝しております。

生産菌の分離・同定においては(元 アステラス製薬 醗酵研究所)江崎正美博士、村松秀行博士に、また化合物の構造決定においては、高瀬茂弘博士、吉村誠司博士に多大なご協力、ご助言をいただき心より御礼申し上げます。また、本研究を遂行するに当たり、終始ご協力を頂きました、アステラス製薬リサーチポートフォリオ&サイエンス部 山下みどり氏、元 アステラス製薬 醗酵研究所 新田久美子氏に心から感謝いたします。

名前は挙げませんでしたが、様々な面でご協力を頂きました元 醗酵研究所の諸氏に感謝いたします。

最後に、本研究をまとめるに当たり、暖かく支えてくれた妻と娘に感謝します。

学術雑誌に発表した論文

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hirohito Kai, Midori Yamashita, Shigehiro Takase, Michizane Hashimoto, Hideyuki Muramatsu, Ikuko Nakamura, Koji Yoshikawa, Masami Ezaki, Kumiko Nitta, Masato Watanabe, Noriaki Inamura and Akihiko Fujie

KB425796-A, a novel antifungal antibiotic produced by *Paenibacillus* sp. 530603

The Journal of Antibiotics 66 (8) 465-471 2013

Hirohito Kai, Midori Yamashita, Shigehiro Takase, Michizane Hashimoto, Hideyuki Muramatsu, Ikuko Nakamura, Koji Yoshikawa, Ryuichi Kanasaki, Masami Ezaki, Kumiko Nitta, Masato Watanabe, Noriaki Inamura and Akihiko Fujie

Identification of ten KB425796-A congeners from *Paenibacillus* sp. 530603 using an antifungal assay against *Aspergillus fumigatus* in combination with micafungin

The Journal of Antibiotics 66 (8) 473-478 2013

Hirohito Kai, Midori Yamashita, Ikuko Nakamura, Koji Yoshikawa, Kumiko Nitta, Masato Watanabe, Noriaki Inamura and Akihiko Fujie

Synergistic antifungal activity of KB425796-C in combination with micafungin against *Aspergillus fumigatus* and its efficacy in murine infection models

The Journal of Antibiotics 66 (8) 479-484 2013